



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2014/2015

**Diana Micaela
Marques Simões**

**Caraterização físico-química de polpas de fruta
com vista à otimização industrial de processos
enzimáticos**



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2014/2015

**Diana Micaela
Marques Simões**

**Caraterização físico-química de polpas de fruta com
vista à otimização industrial de processos
enzimáticos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química Universidade de Aveiro e da Engenheira Pilar Filipa Ribeiro Valinhas Moraes, Diretora do Departamento de Inovação da Frulact – Indústria Agro-Alimentar S.A.

o júri
presidente

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Eng.^a Pilar Filipa Ribeiro Valinhas Moraes
Diretora do Departamento de Inovação Frulact, S.A.

agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à empresa Frulact, S.A. pelo acolhimento e oportunidade de realização do estágio curricular.

Ao meu orientador Prof. Doutor Manuel António Coimbra pela disponibilidade de me acompanhar ao longo do estágio e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

À Eng.^a Pilar Morais pelo tema que me propôs, pela preocupação e acompanhamento constante.

À equipa da Frulact, em especial à Helena Gomes e ao Luís Paulico pelo acompanhamento, preocupação e ajuda prestada.

À Doutora Cláudia Nunes pelo acompanhamento e ajuda no laboratório da Universidade de Aveiro, bem como a todos os membros que compõem o laboratório do professor Manuel António Coimbra.

Aos meus pais, irmã e amigos por todo apoio e força que me transmitiram.

Palavras-chave

Polissacarídeos pécticos; Pectina metil esterase; Desesterificação; Preparados de fruta; Iogurte.

Resumo

Os polissacarídeos pécticos estão presentes naturalmente nas paredes celulares dos frutos e são degradados através da ação de várias enzimas pécticas que são expressas no fruto durante o seu desenvolvimento e maturação. A Pectina Metil Esterase (PME) é uma dessas enzimas, que catalisa a hidrólise dos grupos éster de metilo presentes nos resíduos de ácido D-galacturónico. Uma das propriedades mais importantes destes polímeros na indústria alimentar é a sua capacidade de gelificar na presença de cálcio ou na presença de altas concentrações de açúcar e meio ácido. A capacidade de formarem gel de uma forma ou de outra depende do menor ou maior grau de metilesterificação, respetivamente.

O presente trabalho foi desenvolvido na Frulact - Indústria Agroalimentar, S.A. tendo como objetivo a produção de preparados de fruta com o mínimo de ingredientes e aditivos. A característica principal destes preparados é serem constituídos maioritariamente por polpa de fruta (85%) sendo a restante percentagem açúcar, água e sorbato de potássio (15%). Como nestes preparados não são adicionados compostos com função de conferir textura, a solução encontrada pela empresa para melhorar a textura das polpas foi a funcionalização tecnológica dos polissacarídeos pécticos naturalmente presentes nas polpas de fruta de forma a formarem gel na presença de cálcio. Para tal, utilizou-se uma PME comercial.

Neste trabalho foram produzidos 16 preparados usando polpas de morango (8), framboesa (2), alperce (4) e pêssigo (2). Observou-se que a PME melhorava as características das polpas promovendo a estabilidade da fase dispersa, mantendo o preparado com um aspeto uniforme e aumentando a sua viscosidade. Os preparados de fruta tinham como objetivo ser incorporados em iogurte. Assim, foram realizadas três incorporações diferentes utilizando as dosificações de 9,8, 20 e 30% em relação à massa de iogurte. Constatou-se que alguns preparados desestabilizavam a base de iogurte, adquirindo este um aspeto granuloso após a sua incorporação. Assim, sugeriu-se que a desestabilização estava associada aos polissacarídeos pécticos desesterificados presentes no preparado, que interagiam com as caseínas do iogurte, conduzindo à formação de grânulos. É possível que esta desestabilização tenha ocorrido maioritariamente nos preparados de morango devido aos polissacarídeos pécticos deste fruto serem menos ramificados do que os da framboesa, alperce e pêssigo, podendo o maior grau de ramificação destes polímeros nestes três últimos frutos ter um efeito protetor sobre a base de iogurte, não conduzindo, assim, à interação das cadeias de ácido galacturónico com as proteínas.

Este trabalho permitiu concluir que é possível produzir preparados de fruta sem aditivos, constituídos por 85% de polpa. Estes preparados de fruta só podem ser incorporados em iogurte quando em baixas concentração ou se os polissacarídeos pécticos da polpa tiverem um alto grau de metilesterificação ou tiverem um elevado grau de ramificação.

Keywords

Pectic polysaccharides; Pectin methylesterase; Deesterification; Fruit preparation; Yogurt.

Abstract

Pectic polysaccharides are naturally present in fruits cell walls and are degraded by the action of pectic enzymes that are expressed during the fruit development and maturation. Pectin Metil Esterase (PME) is one of these enzymes, promoting the hydrolysis of the methyl deesterification of D-galacturonic acid residues. One of the most important properties of these polysaccharides in food industry is their capacity to form gel in the presence of calcium or in the presence of high concentrations of sugar and acid environment. This depends on low or high degree of methylesterification, respectively.

The current work was carried on at Frulact-Indústria Agro-alimentar, S.A., with the aim of producing fruit preparations with a minimum of ingredients and additives. The main feature of these preparations is that these are built mostly by fruit pulp (85%) and the remaining percentage corresponds to sugar, water and potassium sorbate (15%). No texture additives were added to improve the texture of the pulps. For the purpose to overcome that absence, a technological functionalization of the pectic polysaccharides naturally present in fruit pulps was performed in order to form a gel in the presence of calcium. This was fulfilled by using commercial PME.

In this work 16 fruit preparations were produced using pulps of strawberry (8), raspberry (2), apricot (4), and peach (2). The PME improved the stability of the pulps dispersed phase, keeping the mixture with an uniform appearance and, at the same time, increasing the viscosity of the preparations. These fruit preparations were applied in yogurt. Three different incorporations took place using 9.8, 20 and 30% of pulp to the mass of yogurt. It was observed in some preparations that the destabilization of the base of the yogurt occurred originating a grainy aspect after incorporation. This destabilization can be linked to the deesterified pectic polysaccharides that interacted with the yogurt caseins, promoting the formation of granules. It was proposed that this destabilization happens mostly in strawberry preparations once the pectic polysaccharides of this fruit are less branched than those of raspberry, apricot and peach, having the branching of these polysaccharides in the last three fruits a protective effect on the base of yogurt, therefore, not leading into the destabilization of proteins.

This work allowed to conclude that it is actually possible to produce fruit preparations with no additives, composed by 85% of pulp. These preparations can only be incorporated in yogurt when present in low concentrations or if the pectic polysaccharides of the pulp have a high degree of methylesterification of a high degree of branching residues.

Índice

Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	viii
Índice de Abreviaturas	x
1. Apresentação da Frulact	1
2. Introdução	2
2.1. Parede celular	2
2.2. Polissacarídeos pécticos	3
2.2.1. Estrutura dos polissacarídeos pécticos	3
2.2.2. Gelificação das pectinas	6
2.2.3. Pectinas comerciais	8
2.2.3.1. Fontes de pectina	9
2.2.3.2. Extração dos polissacarídeos pécticos	9
2.2.3.3. Aplicações comerciais	10
2.2.3.4. Legislação	14
2.3. Reações enzimáticas - Enzimas pécticas	14
2.3.1. Aplicações comerciais	16
2.3.2. Pectina Metil Esterase	17
2.3.3. Legislação	19
2.4. Reações não enzimáticas que ocorrem durante o processamento de alimentos de origem vegetal	20
2.5. Amadurecimento dos frutos	20
2.6. Preparados de fruta	25
2.6.1. Reologia dos preparados de fruta	27
2.7. Produção e propriedades físico-químicas do iogurte	28
2.8. Análise de mercado	30
3. Contextualização e objetivo do projeto	32
4. Materiais e métodos	35
4.1. Produção de polpas de fruta e preparados de fruta	35
4.1.1. Preparação das polpas de fruta	35
4.1.2. Produção de preparados de fruta <i>FruitOnly</i>	37

4.1.3. Produção de polpa pasteurizada e preparado sem PME (controles)	38
4.2. Caracterização físico-química de polpas e preparado de fruta	39
4.2.1. Teor de sólidos solúveis (TSS).....	40
4.2.2. pH.....	40
4.2.3. Fluidéz e viscosidade	40
4.2.4. Cor (CIELab).....	42
4.2.5. Análise dos polissacarídeos pécticos.....	42
4.2.5.1. Preparação de resíduos insolúveis em álcool (AIR) e extrações sequenciais dos AIRs com água e imidazol	42
4.2.5.2. Análise de açúcares	43
4.2.6. Determinação do grau de metilesterificação	45
4.2.7. Análise por espectrofotoscopia de infravermelho médio (FT-IR-ATR).....	47
4.3. Avaliação das características visuais e estabilidade das polpas e preparados de fruta...	47
4.4. Avaliação da estabilidade do iogurte após a incorporação do preparado	48
4.5. Análise Estatística.....	50
5. Resultados e discussão	51
5.1. Caracterização físico-química das polpas e preparados de fruta	51
5.1.1. Teor de sólidos solúveis	51
5.1.2. pH.....	53
5.1.3. Fluidéz e viscosidade	54
5.1.3.1. Relação entre o tratamento da polpa com a enzima PME e a diminuição da fluidez (aumento da viscosidade)	54
5.1.3.2. Estudo da viscosidade ao longo do tempo nas polpas e preparados	59
5.1.4. Cor.....	64
5.2. Análise aos polissacarídeos pécticos presentes naturalmente nas amostras	69
5.2.1. Análise por espectrofotoscopia de infravermelho (FT-IR) dos resíduos insolúveis em álcool (AIR).....	69
5.2.2. Análise à composição em açúcares das polpas	71
5.2.3. Grau de metilesterificação das polpas e preparados de morango 060.....	76
5.3. Avaliação das características visuais e estabilidade das polpas e preparados de fruta ao longo do tempo de amostragem	77
5.4. Avaliação da estabilidade da base láctea (iogurte)	79

6. Conclusão	86
7. Trabalho futuro	88
Referências.....	89

Índice de Figuras

Figura 1 – Logótipo da empresa Frulact.....	1
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos polissacarídeos pécticos mostrando os seus quatro domínios: homogalacturonanas (HG); xilogalacturonanas (XGA); ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). A representação da estrutura não está quantitativamente precisa com o que existe na realidade nas paredes celulares: HG deve ser aumentada em 12,5 vezes e a RG-I em 2,5 vezes aproximadamente. Adaptada de [12]......	5
Figura 3 - Formação de gel na presença Ca^{2+} - o modelo da “caixa de ovos”: a) cadeias de pectina com baixo grau de metilesterificação dispersas; b) dímeros e c) dímero - interações electrostáticas do ião cálcio com os grupos carboxílicos desesterificados. Adaptada de [20]. .	7
Figura 4 – Esquema resumo das parâmetros que é necessário ter em atenção na escolha do tipo de pectina. Adaptado de [28]......	11
Figura 5 – Representação esquemática da pectina (só homogalacturonanas) e das reacções enzimáticas e não enzimáticas que podem ocorrer (PME=Pectina Metil Esterase; Ca^{2+} =Ligações cruzadas de cálcio; PG=Poligalacturonase; PL=Pectina liase; T=Temperatura; R1/R2= Fragmento inicial e final do polímero de pectina, respetivamente. Adaptada de [38].	16
Figura 6 – Reação catalisada pela Pectina Metil Esterase. Adaptada de [44].	18
Figura 7 – Processo industrial contínuo de confeção de um preparado de fruta.	27
Figura 8 – Consistómetro de Bostwick: a) compartimento fechado, com a amostra e b) compartimento aberto, com a amostra, permitindo que esta escoe ao longo do consistómetro [102].	41
Figura 9 –Viscosímetro de Brookfield [103].....	41
Figura 10 – Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote de morango 060 correspondente a morango inteiro congelado estático: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p<0,05$) quando o fator tempo	

é fixado e com ^{ABC} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.60

Figura 11 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote de 108 e 109 correspondente a morango IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.60

Figura 12 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote 113 correspondentes a morango IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.61

Figura 13 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote framboesa migalhas IQF a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.62

Figura 14 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote alperce IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a

amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.63

Figura 15 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote pêssago por IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.....63

Figura 16 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c, d, e, f, g e h correspondem às amostras de morango estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra M060_1mm (I), b) à amostra M060_0,5 mm (L), c) à amostra M060_3 mm (L), d) à amostra M108_3 mm (L), e) à amostra M109_1 mm (I), f) à amostra M109_ 3 mm (L), g) à amostra M113_1 mm (I) e h) à amostra M113_3 mm (L).66

Figura 17 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a e b correspondem às condições estudadas para as amostras de framboesa. O gráfico a) corresponde à amostra F_30 min e b) à amostra F_60 min.67

Figura 18 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c e d correspondem às amostras de alperce estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra de alperce 25_1 mm (I), b) à amostra de alperce 25_3 mm (L), c) à amostra de alperce 27_1 mm (I) e d) à amostra de alperce 27_ 3 mm (L).68

Figura 19 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c e d correspondem às amostras de pêssgo estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra de P_1 mm (I) e b) à amostra de P_3 mm (L).	69
Figura 20 – Espectros de FT-IR das polpas de morango e framboesa, os espectros encontram-se normalizados entre 0 e 1. Assim, o gráfico encontra-se organizado por amostras: absorvância entre 0 e 1 amostras de morango inteiro estático (lote 060), absorvância ente 1 e 2 morango IQF (lotes 108, 109 e 113) e absorvância entre 2 e 3 amostra de framboesa. I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial.	70
Figura 21 – Espectros de FT-IR das polpas de alperce e pêssgo, os espectros encontram-se normalizados entre 0 e 1. Assim, o gráfico encontra-se organizado por amostras: absorvância entre 0 e 1 amostras de alperce (lotes 25 e 27) e absorvâncias entre 1 e 2 amostras de pêssgo. I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial.....	71
Figura 22 – Imagens de iogurte: a) iogurte batido açúcarado a 8%, b) um iogurte batido açúcarado a 8% com o preparado 060_1 mm incorporado a 9,8% e c) um iogurte batido açúcarado a 8% com o preparado 060_1 mm incorporado a 30 %.	80
Figura 23 – Espectros de FT-IR correspondentes ao iogurte com preparado incorporado (linha azul) e preparado de fruta (linha vermelha). Os espectros de precipitado de iogurte e preparado de fruta encontram-se normalizados entre 0 e 1.	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Teor em pectina em alguns frutos. Adaptado de [21].	9
Tabela 2 - Pectinas recomendadas para diferentes tipos de produtos. Adaptado de [28].	13
Tabela 3 - Produto com o mesmo posicionamento de mercado do iogurte que se pretende obter.	31
Tabela 4 – Lotes de fruta utilizados para a transformação em polpa.	36
Tabela 5 – Formulação geral dos preparados FruitOnly.	37
Tabela 6 – Formulação geral dos controlos: polpa pasteurizada e preparado sem PME.	39
Tabela 7 – Soluções de pectina para aplicação em iogurte a 30%.	49
Tabela 8 – Teor de sólidos solúveis (° Bx) para cada polpa e preparado de morango (M), framboesa (F); alperce (A) e pêssago (P).	53
Tabela 9 – Valores de pH determinados para as polpas e preparado de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssago (P).	54
Tabela 10 – Fluidez em cm/60 s no dia 0, 1 e 2 para a polpa, condição de polpa congelada, e no dia 1 para preparados de morango (M).	56
Tabela 11 – Fluidez em cm/60 s no dia 0, 1 e 2 para a polpa, condição de polpa congelada, e no dia 1 para os preparados de framboesa (F), alperce (A) e pêssago (P).	58
Tabela 12 – Composição em açúcares dos AIR das polpas de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssago (P).	73
Tabela 13 – Composição em açúcares dos AIRs das amostras de polpa e preparado provenientes do lote M060.	74
Tabela 14 – Composição em açúcares dos extratos de água e imidazol de polpa e preparado provenientes do lote M060.	75
Tabela 15 – Grau de metilesterificação nos extratos de água e imidazol obtidos a partir do AIR das amostras de polpa e preparado M060 com corte de 1, 0,5 e 3 mm.	77

Tabela 16 – Características visuais das polpas e preparados de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssgo (P) ao longo do tempo.....	79
Tabela 17 – Resultados da incorporação de soluções de pectina comerciais em iogurte batido.	83

Índice de Abreviaturas

AIR – resíduos insolúveis em álcool

Ara – arabinose

CCP – complexo de cálcio coloidal

DM – grau de metilesterificação

Fuc – fucose

Gal – galactose

Glc - glucose

HG - homogalacturonanas

HM - pectinas com alto grau de metilesterificação

IQF – *Individual Quick Frozen*

Man - manose

LM - pectinas com baixo grau de metilesterificação

LMA – pectinas com baixo grau de metilesterificação amidadas

OGM – organismo geneticamente modificado

PG – poligalacturonase

pI – ponto isoelétrico

PL – pectato liase

PME - pectina metil esterase

RG-I - ramnogalacturonanas do tipo I

RG-II - ramnogalacturonanas do tipo II

Rha – ramnose

SPME – microextração em fase sólida

TSS - teor em sólidos solúveis

UA - ácido urónico

XGA - xilogalacturonanas

Xyl - xilose

1. Apresentação da Frulact

A Frulact (Figura 1), empresa fundada em 1987, é especializada no desenvolvimento, transformação e produção de preparados de fruta para aplicação na indústria de laticínios, gelados, bebidas, pastelaria industrial, entre outros. Colabora com multinacionais como a Nestlé, Danone, Yoplait e Unilever. Nos últimos 27 anos, esta empresa agro-alimentar tem apostado numa estratégia de internacionalização e atualmente possui unidades industriais em quatro países: Portugal, França, Marrocos e África do Sul.

Tem como principal objetivo desenvolver, para cada cliente, produtos e serviços que acrescentem valor às suas marcas, diferenciando-se pela qualidade e inovação. Desta forma a empresa assegura o desenvolvimento de novos produtos e processos com nível científico e tecnológico avançado. A empresa aposta na pro-atividade, criatividade e inovação, bem como o desenvolvimento de ideias e lançamento de novos produtos tendo sempre em conta a análise de mercado e tendência, bem como as exigências do consumidor.

A empresa é constituída por três unidades industriais em Portugal: Maia, Ferro e Tortosendo. A unidade Frulact Maia é a sede administrativa, bem como uma unidade de produção industrial e um centro de Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI) - Frutech. Na Frutech, local onde se realizou o estágio, existe uma unidade piloto de “*up-grade*” tecnológico, laboratórios de microbiologia alimentar e de caracterização físico-química, uma sala de provas e análise sensorial da fruta e seus derivados e uma biblioteca técnico-científica. Com este centro, a empresa pretende o desenvolvimento de novos produtos e inovação de forma a aumentar a capacidade de resposta às necessidades do cliente, reduzir o *time-to-market*, e o ajuste rápido às mudanças tecnológicas tendo sempre em conta a eficiência energética e o impacto ambiental.



Figura 1 – Logótipo da empresa Frulact.

2. Introdução

Diversos polissacarídeos e os seus derivados (dos quais destacam-se pectinas, amidos, e carragenanas) são usualmente utilizados na indústria alimentar devido às propriedades reológicas e de textura que estes compostos conferem ao produto final. Os preparados de frutas apresentam polissacarídeos nas suas formulações, no entanto, a crescente tendência de mercado por produtos naturais e *clean label* despoletaram na indústria a necessidade de inovar os produtos apresentando novos recursos para reduzir ou eliminar a adição de polissacarídeos bem como de outros aditivos, tais como aromas e conservantes, mantendo as características do produto original. Uma solução encontrada para os preparados de fruta passa pela funcionalização da fruta, recorrendo a auxiliares tecnológicos como as enzimas.

O presente trabalho estuda a funcionalização das pectinas recorrendo à enzima pectina metil esterase (PME). Assim, na monografia da presente dissertação será abordados os conceitos de parede celular, polissacarídeos pécticos, mecanismos de gelificação, reações enzimáticas, reações não enzimáticas que ocorrem durante o processamento de alimentos de origem vegetal, bem como a aplicação de polissacarídeos e enzimas pécticas na indústria alimentar e ainda uma breve referência ao amadurecimento dos frutos, dando ênfase especial ao morango, alperce, pêssogo e framboesa.

2.1. Parede celular

A parede celular é a estrutura que delimita o tamanho e a forma da célula, estando envolvida no crescimento e desenvolvimento, comunicação intercelular e interação com o meio ambiente [1]. É constituída por uma rede de polissacarídeos, proteínas e outros polímeros, como a lenhina, formando uma estrutura rígida, organizada e dinâmica. As paredes celulares variam consoante a espécie, porém todas têm uma estrutura básica similar. Assim, estas são compostas por microfibrilhas de celulose que estão embutidas numa matriz de polissacarídeos altamente hidratada, sendo as duas principais classes de polissacarídeos desta matriz, as hemiceluloses e os polissacarídeos pécticos. [2]. A parede celular primária contém uma média de 35% de polissacarídeos pécticos, 25% de celulose, 20% de hemicelulose e 10% de proteínas estruturais. No entanto, a composição varia consoante o tipo de célula, espécie de origem vegetal e o estado de desenvolvimento [3].

2.2. Polissacarídeos pécticos

Os polissacarídeos pécticos são uma família de hidratos de carbono com uma estrutura complexa. Localizam-se nas paredes celulares primárias das plantas superiores (frutos e vegetais), estando em maior concentração na lamela média (zona de união de duas células vizinhas) [4]. A sua função principal na planta é como agente hidratante e serve como material de suporte para a rede celulósica, contribuindo para a firmeza e estrutura do tecido da planta. Os polissacarídeos pécticos ainda desempenham outras funções: apresentando um papel importante no crescimento celular, desenvolvimento, defesa, adesão célula-célula, estruturação da parede celular, expansão celular, ligação a iões, porosidade da parede celular, fatores de crescimento e enzimas, hidratação das sementes, desenvolvimento dos frutos, entre outras [5, 6].

A Sociedade de Química Americana classifica os polissacarídeos pécticos presentes na natureza em quatro grupos principais: (a) protopectina é a parte insolúvel em água dos polissacarídeos pécticos, encontrada no tecido da planta; (b) ácidos pécticos ou pectato são a cadeia de galacturonanas com quantidades negligenciáveis de grupos metílicos; (c) ácidos pectínicos ou pectinatos são as moléculas que apresentam quantidades variáveis de grupos metílicos na cadeia de galacturonanas; (d) pectinas (polimetilgalacturonato) são as cadeias de galacturonanas com pelo menos 75% dos resíduos de ácido galacturónico esterificados com metanol [7, 8].

Os polissacarídeos pécticos quando extraídos e aplicados na indústria alimentar têm funções de agente estabilizante, gelificante, espessante, emulsionante e conservante, sendo utilizados numa grande variedade de produtos alimentares tais como preparados de fruta, compotas, geleias e sopas. Podem ainda ter inúmeros benefícios para a saúde humana quando ingeridos, tais como a redução dos níveis de glucose e colesterol, prevenção do cancro [6] e estimulação do sistema imunitário [9].

Comercialmente, os polissacarídeos pécticos desesramificados são denominados por pectinas. Por norma, considera-se que a pectina é constituída por cadeias de ácido D-galacturónico parcialmente metilesterificado. As pectinas comerciais são divididas em dois grupos: as pectinas com alto grau de metilesterificação e as pectinas com baixo grau de metilesterificação sendo este último grupo dividido em dois: pectinas não amidadas e amidadas.

2.2.1. Estrutura dos polissacarídeos pécticos

A estrutura química dos polissacarídeos pécticos (Figura 2) é muito complexa e durante as últimas décadas diversos autores têm-se dedicado ao seu estudo. A estrutura varia consoante a

fonte, método de extração, o estado de crescimento ou de maturação da espécie em estudo e as condições ambientais. Foram reconhecidos nos polissacarídeos pécticos quatro domínios principais e distintos: as homogalacturonanas (HG), as xilogalacturonanas, as ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e as ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) [10].

As HG são uma sequência longa e linear de resíduos de ácido D-galacturónico unidos por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) [11]. Os resíduos de ácido D-galacturónico podem-se encontrar parcialmente metilesterificados no grupo carboxílico ou acetilados no *O*-2 ou *O*-3 [12]. O padrão de metilesterificação e acetilação varia de fonte para fonte. Pensa-se que a metilesterificação está relacionada com o desenvolvimento da planta e com a forma específica dos tecidos [11]. Os grupos carboxílicos não metilesterificados estão carregados negativamente, podendo interagir ionicamente com o cálcio e formar um gel estável com outras moléculas de HG (ver tópico 2.2.2) [11]. A acetilação pode levar à diminuição da ligação inter-polímeros, levando a que as paredes celulares fiquem fracas e instáveis [13]. Normalmente, os polissacarídeos pécticos têm elevado grau de metilação e baixo grau de acetilação [14]. As HG representam a grande parte dos polissacarídeos pécticos presentes na parede celular, existindo numa percentagem superior a 60% [11, 12].

Nas XGA, a cadeia principal é constituída apenas por ácido D-galacturónico com ramificações no *O*-3 por resíduos únicos de $\beta - D - xilose$. Pode estar presente em todo o tipo de tecidos porém encontra-se maioritariamente em órgãos reprodutivos ou de armazenamento [15]. As XGA e as HG constituem a região lisa (*smooth region*) dos polissacarídeos pécticos [4].

Nas RG-I, a cadeia principal é constituída por resíduos de ácido D-galacturónico e L-ramnose [$\rightarrow 4$]- $\alpha - D - GalA - (1 \rightarrow 2) - \alpha - L - Rha - (1 \rightarrow)$] [16]. Por norma, cerca de 50% dos resíduos de ramnose são ramificados no *C*-4 por resíduos de arabinose e galactose, que formam arabinanas, galactanas e arabinogalactanas [14]. As RG-I representam cerca de 20 a 35% da constituição dos polissacarídeos pécticos [12].

As RG-II são o domínio mais complexo, representando cerca de 10% da pectina [12]. A cadeia principal é semelhante às HG, sendo constituída apenas por resíduos de ácido D-galacturónico. As ramificações surgem no *C*-2 ou *C*-3 do ácido galacturónico. Estas podem ser constituídas por doze açúcares diferentes, incluindo a ramnose, e podem ocorrer mais de vinte diferentes tipos de ligações entre os açúcares. Podem fazer parte das cadeias laterais açúcares menos comuns como a apiose (Api), ácido acérico, ácido 3-desoxi-lixo-2-heptulosárico (Dha) e ácido 3-deoxi-mano-2-

octulosónico (Kdo) [11]. São as que mais contribuem para a consolidação da parede celular e a sua estrutura é conservada entre as diferentes espécies de plantas [11]. Ambas as cadeias de RG constituem a região ramificada (*hairy regions*) dos polissacarídeos pécnicos [4]. A estrutura das HG pode estar covalentemente ligada às RG-I e RG-II. Os polissacarídeos pécnicos podem estar ligados por ligações cruzadas às hemiceluloses, compostos fenólicos e proteínas [11]. No entanto, a organização dos polissacarídeos pécnicos na parede celular ainda não está completamente elucidada [17].

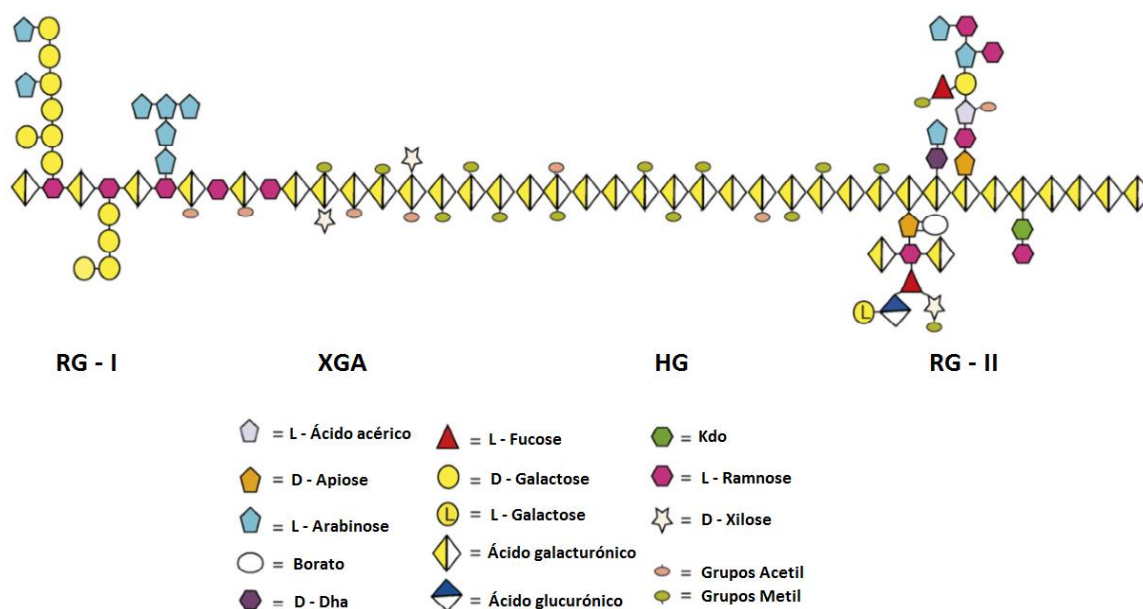


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos polissacarídeos pécnicos mostrando os seus quatro domínios: homogalacturonanas (HG); xilogalacturonanas (XGA); ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II). A representação da estrutura não está quantitativamente precisa com o que existe na realidade nas paredes celulares: HG deve ser aumentada em 12,5 vezes e a RG-I em 2,5 vezes aproximadamente. Adaptada de [12].

A síntese dos polissacarídeos pécnicos ocorre simultaneamente em numerosos complexos de Golgi na célula, num processo que parece incluir a compartimentalização de enzimas de biossíntese específicas que conduzem à construção de polissacarídeos pécnicos complexos. Estes são polimerizados no *cis*Golgi, metilesterificados no *medial*Golgi e adquirem as cadeias laterais no *trans*Golgi cisternae. São secretados para a parede celular na forma de polissacarídeos pécnicos com elevado grau de metilesterificação [18]. Posteriormente, são modificados pelas enzimas pécnicas [19]. No final, a massa molecular dos polissacarídeos pécnicos pode variar entre os 25 e os 360 kDa [20].

2.2.2. Gelificação das pectinas

Uma das propriedades das pectinas é a capacidade de gelificarem na presença de cálcio ou então na presença de açúcar em meio ácido, sendo esta a propriedade que as torna um importante ingrediente na indústria alimentar. A capacidade da pectina formar gel de uma forma ou de outra, depende do seu grau de metilesterificação. As pectinas com baixo grau de metilesterificação (LM) formam gel na presença de cálcio. Por sua vez, as pectinas com alto grau de metilesterificação (HM) formam gel em meio ácido com elevado teor de açúcar. As características do gel podem variar em função do grau de polimerização das homogalacturonanas, do grau de metilesterificação, da localização dos grupos éster de metilo na cadeia e do grau de ramificação e de acetilação. As condições às quais as pectinas são submetidas alteram as características do gel, tais como a temperatura, pH, açúcar e cálcio [16]. A concentração de pectina existente naturalmente no produto ou adicionada também irá afetar as características do gel formado [21].

As características físicas do gel são a consequência da formação da rede tridimensional contínua de moléculas do polímero que estão ligadas por ligações cruzadas. O gel que se forma, do ponto de vista molecular, pode ser descrito pelos seguintes elementos: (a) zonas de junção onde duas ou mais cadeias estão unidas por ligações cruzadas, estas zonas podem envolver uma simples ligação covalente ou a combinação de ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre duas cadeias que se encontram lado a lado; (b) segmentos de inter-junção de polímeros que estão relativamente móveis tornando o gel mais flexível e (c) água retida na rede do polímero [21].

a) Mecanismo de gelificação das pectinas com baixo grau de metilesterificação (LM)

As pectinas LM gelificam na presença de iões de cálcio (Ca^{2+}). Existem várias teorias que explicam a gelificação das pectinas na presença de cálcio, no entanto o modelo da “caixa de ovos” é o mais cientificamente aceite.

O modelo da “caixa de ovos” foi descrito pela primeira vez para o gel que é formado com alginato na presença de cálcio. Este modelo envolve uma fase de dimerização e depois uma fase de agregação dos vários dímeros (Figura 3). Para ocorrer a formação de gel é necessário que um número sucessivo de unidades de ácido galacturónico se encontrem desesterificadas. Porém, este número não é consensual, uma vez que nos estudos publicados na literatura, existem autores que estimaram 9 [22], outros de 6-13 [23], 14 [24] e acima de 20 resíduos [25]. A gelificação das pectinas com baixo grau de esterificação envolve interações electroestáticas entre os catiões e as cavidades carregadas negativamente formadas pelas cadeias do polímero, onde os catiões são

inseridos. As duas cadeias de polímero são estabilizadas por forças de *van der Waals* e por pontes de hidrogénio [26].

Nas pectinas LM, o teor de cálcio tem uma grande influência nas propriedades reológicas do gel formado. Assim, quando o teor de cálcio é muito elevado, pode favorecer a sinerese ou a precipitação das cadeias de pectina [20].

Um fator a ter em consideração é a disponibilidade do cálcio para formar gel com a pectina, que diminui com a presença agentes de sequestrantes que existem naturalmente nos produtos alimentares, como por exemplo o citrato e outros ácidos orgânicos presentes na fruta, ou aqueles que são adicionados, tais como di ou poli-fosfatos. No entanto, uma certa quantidade de um agente sequestrante, como por exemplo, o citrato, é necessária para produzir um gel desejável. A reatividade do cálcio é influenciada pela proporção e arranjo dos grupos carboxílicos na cadeia de pectina. Assim, a reatividade aumenta com a diminuição do grau de esterificação [27].

Na natureza, a formação de gel na presença de iões de cálcio tem como finalidade conferir estabilidade à lamela média da parede celular da planta [21].

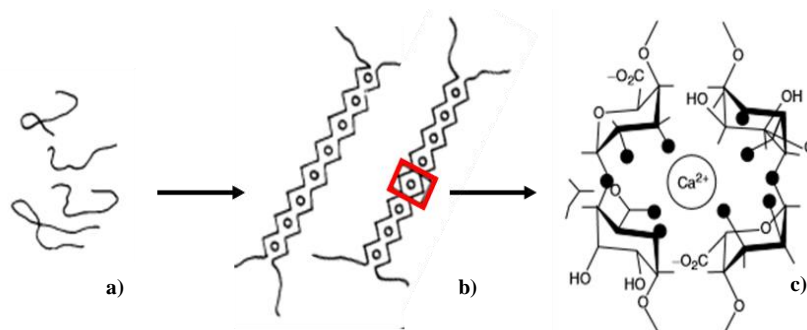


Figura 3 - Formação de gel na presença Ca^{2+} - o modelo da “caixa de ovos”: a) cadeias de pectina com baixo grau de metilesterificação dispersas; b) dímeros e c) dímero - interações electrostáticas do ião cálcio com os grupos carboxílicos desesterificados. Adaptada de [20].

b) Mecanismo de gelificação das pectinas com alto grau de metilesterificação (HM)

As pectinas com alto grau de metilesterificação (HM) que ocorrem naturalmente não têm tanta afinidade para formar gel com o cálcio como as LM. Assim, a gelificação das pectinas HM requer baixo pH e baixa atividade da água. Geralmente, o pH deve variar entre 2,5 e 3,8 e o teor em sólidos solúveis (TSS) deve encontrar-se entre 55 a 85%. Contudo, o TSS pode-se encontrar abaixo de 55% quando o grau de metilesterificação é elevado, e o pH deve ser inferior a 3,8 quando o grau de metilesterificação ou TSS é elevado [28].

Um elevado teor de sólidos solúveis cria uma atividade da água baixa, o que promove as interações pectina-pectina em vez de as interações pectina-solvente. Por sua vez, o pH baixo reduz a dissociação dos grupos carboxílicos, diminuindo assim a repulsão electrostática. O gel é mantido por ligações de hidrogénio, entre os grupos carboxílicos não dissociados e os grupos álcool secundários, e por interações hidrofóbicas, entre os grupos éster de metilo. Por conseguinte, um aumento do grau de metilesterificação e pH baixo aumenta a capacidade de formação de gel. As interações entre os polímeros de pectina criam as chamadas "zonas de junção", que geram a base da rede tridimensional do gel de pectina [28].

Um aspeto a ter em consideração quando se pretende obter um gel na presença de pectina HM é o açúcar utilizado, uma vez que a mudança da natureza deste tem um efeito notório no desempenho da pectina, por exemplo, a substituição de açúcar de cana por xarope de glucose conduz à perda da força do gel, outros açúcares, tais como, a maltose, exibem um efeito similar [27].

As pectinas LM são quimicamente mais estáveis ao calor e à humidade do que as pectinas HM, dado que as HM tem tendência para desesterificar em atmosfera húmida. Tanto as LM como as HM são relativamente estáveis a pH baixo, característico das compotas, geleias e preparados de fruta [21].

A acetilação pode evitar a gelificação da pectina porém a presença de grupos acetilo faz da pectina um útil emulsionante e estabilizante. Tal é possível devido ao facto de potenciarem a natureza hidrofóbica das moléculas e fornecerem um carácter ativo de superfície. Isto significa que podem atuar como agente interfacial óleo/água e ar/água [28]

2.2.3. Pectinas comerciais

As pectinas comerciais são estruturalmente menos complexas do que os polissacarídeos pécticos presentes na parede celular da planta, devido às mudanças estruturais e quebras que ocorrem nas cadeias destes durante os processos industriais de extração [20].

Comercialmente existem duas formas de pectina disponíveis: as pectinas de alto grau de metilesterificação e baixo grau de metilesterificação e, ainda, existem duas versões desta última: a forma convencional e a forma amidada. Cada forma de pectina tem comportamentos e funções diferentes. As pectinas podem ainda serem divididas em três grupos, de acordo com o tempo que demoram a gelificar. Assim, existem as pectinas de gelificação rápida, média e lenta [21].

2.2.3.1. Fontes de pectina

A habilidade da pectina para formar gel depende do seu peso molecular, grau de esterificação e de ramificação. Assim, pectinas obtidas de diferentes fontes não apresentam a mesma habilidade para formar gel devido às variações dos parâmetros acima referidos.

As pectinas comerciais são extraídas a partir da polpa da maçã e da casca dos citrinos que apresentam elevada percentagem de polissacarídeos pécticos, que por norma, são sub-produtos das indústrias dos sumos de fruta. Também têm sido usadas outras fontes de pectina tais como: beterraba e resíduos provenientes dos girassóis [21]. A Tabela 1 indica o teor em pectina em alguns frutos.

Tabela 1 - Teor em pectina em alguns frutos. Adaptado de [21].

Fruta	% Substâncias pécticas (peso húmido)
Maçã (<i>Malus spp</i>)	0,5-1,6
Polpa da maçã	1,5-2,5
Banana (<i>Musa acuminata L.</i>)	0,7-1,2
Beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Casca da laranja (<i>Citrus sinensis</i>)	3,5-5,5
Morangos (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6-0,7
Pêssegos (<i>Prunus pérsica</i>)	0,1-0,9
Polpa de beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Polpa de Limão (<i>Citrus limon</i>)	2,5-4,0

2.2.3.2. Extração dos polissacarídeos pécticos

A extração dos polissacarídeos pécticos de tecidos vegetais é realizada através de um processo industrial onde ocorrem reações de desesterificação e despolimerização que levam à quebra de algumas cadeias laterais constituídas por açúcares neutros, diminuindo o peso molecular dos polissacarídeos pécticos.

Antes do processo de extração, a matéria-prima é sujeita a pré-tratamentos (branqueamento, lavagem, secagem, entre outros). Esta etapa tem como finalidade inativar as enzimas para evitar a degradação das moléculas dos polissacarídeos pécticos. E, assim também, consegue-se aumentar a estabilidade durante o transporte e armazenamento [20].

A maior parte dos polissacarídeos pécticos são extraídos através de uma solução aquosa ácida quente (pH entre 1,5 e 3 e temperatura entre 70 a 90 ° C) seguida por uma precipitação com um

solvente orgânico. O tempo de extração e a temperatura variam consoante a matéria-prima a ser usada, assim também com o produto final que se pretende obter [20, 27, 28]. No final da extração permanecem apenas as cadeias de ácido galacturónico mais ácido-estáveis [27]. Por exemplo, pectinas comerciais extraídas de citrinos, por norma, tem um teor de ácidos urónicos entre 85 a 90%, teor em açúcares neutros inferior a 10% e um grau de esterificação de 55 a 80% [27].

Os polissacarídeos pécticos também podem ser extraídos por um processo alcalino. Contudo, em condições alcalinas ou neutras, mesmo à temperatura ambiente, são muito suscetíveis às reações de β -eliminação [27]. Esta reação consiste na quebra da ligação glicosídica entre dois resíduos de ácido galacturónico e na formação de uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5, por consequência existe uma redução do peso molecular. O resíduo sujeito à reação de β -eliminação tem que ter o grupo carboxílico esterificado pelo que a extensão da degradação das pectinas depende do seu grau de metilesterificação [29]. Por esta razão, a extração alcalina não é geralmente utilizada na produção de pectinas comerciais [27].

Com a finalidade de obter pectinas comerciais para usar na indústria alimentar é necessário existir um passo de purificação. Assim, a pectina é separada do extrato por precipitação com um álcool (isopropanol, etanol ou metanol) ou então, por precipitação com um sal insolúvel por adição de um catião polivalente, geralmente, o alumínio. Em seguida, o precipitado obtido é lavado com álcool e pressionado para remover impurezas e, por fim, é seco e moído para obter pectina em pó [20].

Os polissacarídeos pécticos provenientes destas extrações apresentam sempre um grau de metilesterificação superior a 55% [20], dando portanto origem a pectinas comerciais com alto grau de metilesterificação. Para obter pectinas com baixo grau de metilesterificação, as pectinas HM são submetidas a um processo de saponificação que baixa o grau de metilesterificação de 70% para 30%. Por sua vez, as pectinas LM amidadas são produzidas por suspensão da pectina seca em álcool e, em seguida, são tratadas com uma solução de amoníaco. Assim, um número definido de grupos éster de metil são mudados para grupos amida [30].

2.2.3.3. Aplicações comerciais

A escolha do tipo de pectina a utilizar em determinado tipo de alimento vai depender das características intrínsecas deste, como por exemplo, pH, teor em sólidos solúveis (TSS), a textura pretendida, temperatura de processamento, presença de iões e tempo de vida útil. Seguidamente, é

necessário ter em consideração as características da pectina, como por exemplo, o grau de metilesterificação (Figura 4 - parâmetros relevantes) [26, 28].

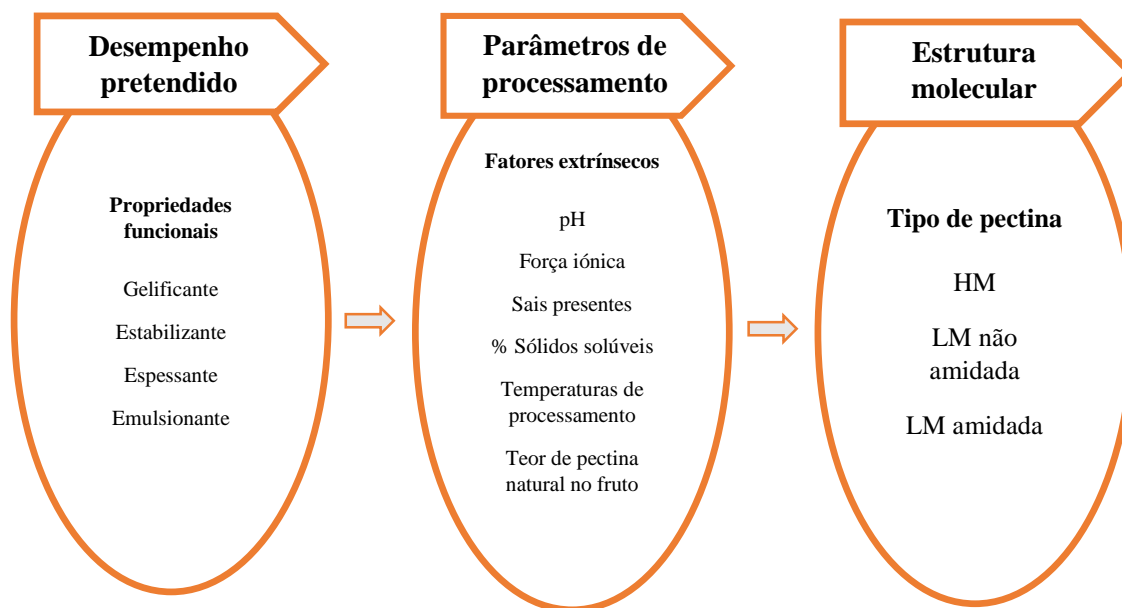


Figura 4 – Esquema resumo das parâmetros que é necessário ter em atenção na escolha do tipo de pectina. Adaptado de [28].

Na indústria alimentar, as pectinas são utilizadas como agente gelificante em vários produtos, tais como, preparados de fruta, compotas, geleias e produtos de confeitaria. Também é habitualmente utilizada como estabilizante de bebidas ácido-lácteas ou iogurtes, e como espessante em molhos. De seguida, são apresentadas as várias aplicações das pectinas na indústria alimentar ao longo do texto e na Tabela 2.

a) Preparados de fruta para aplicação em iogurtes

Nos preparados de fruta para aplicar em iogurtes, por norma utilizam-se as pectinas LM, que criam um gel macio, tixotrópico que é suficientemente firme para garantir a distribuição uniforme da fruta, mesmo em grandes contentores, permitindo também que o preparado de fruta seja facilmente introduzido no iogurte. A combinação da pectina com gomas provenientes de plantas, tal como a goma de alfarroba pode neutralizar a sinerese que ocorre no iogurte [28].

Nos preparados de fruta para iogurtes com dupla camada, a pectina diminui as trocas entre o preparado de fruta e o iogurte. Contudo, neste tipo de aplicação pode existir a migração dos iões de cálcio do iogurte para a fase de fruta, o que pode produzir um gel rapidamente indesejável. O problema pode ser ultrapassado pelo uso de pectina com baixa reatividade para o cálcio, e saturando a pectina do preparado de fruta com cálcio [28]. Também o desenvolvimento de um

preparado com o pH final entre 3,5 a 4,0 ajuda a evitar as interações com o iogurte [27]. A aplicação de pectina HM em preparados de fruta para iogurte é pouco habitual, uma vez que se limita a preparações com teores de sólidos solúveis acima dos 60% e pH abaixo de 3,5. Assim, as pectinas LM são as mais usadas neste tipo de preparados, uma vez que podem ser utilizadas na gama de sólidos solúveis e pH encontradas normalmente nestes produtos. Para os preparados de fruta com pH entre 3,6 e 4,0 é recomendado usar uma pectina LM com reatividade média para o cálcio. Quando o teor em sólidos solúveis é inferior a 50% é recomendado o uso de uma pectina LM com elevada reatividade para o cálcio [28].

Na formulação de um preparado de fruta é necessário ter em conta que esta deve ser adaptada aos equipamentos e sistemas em uso no produtor de preparados de fruta bem como aos utilizados na indústria iogurteira. Também na escolha dos ingredientes deve-se ter em atenção o processamento a que estes vão ser sujeitos, para no final obter um produto com as propriedades desejadas [27].

b) Compotas, geleias e doces

Os primeiros produtos a aproveitar as propriedades intrínsecas da pectina existente naturalmente nos frutos foram as compotas de frutos, que têm um teor em sólidos solúveis (TSS) entre 60 a 70% e apresentam um intervalo de pH entre 3,0 e 3,3. Quando é adicionada uma pectina comercial, por norma, utiliza-se uma HM. A quantidade e o tipo de pectina a utilizar irá também variar conforme a natureza e teor de fruta, o TSS desejável, e o processo de fabrico, bem como, as propriedades desejadas do produto final [27]. As compotas de fruta são preparadas a partir de combinações de açúcar e xarope de glucose, aromatizadas com aromas sintéticos e acidificadas com ácido cítrico, podendo conter ainda polpa de fruta e sumo. Usualmente, a concentração da pectina HM adicionada é de 1 a 3%. A pectina proporciona uma textura e libertação de aroma superiores, em comparação com outros agentes de gelificação, porém pode ser problemática de manusear durante o processamento devido à formação de gel a temperaturas elevadas ($\sim 70^\circ\text{C}$) e à sua sensibilidade para o pH e TSS [28].

Com as alterações dos padrões de consumo, têm surgido compotas, geleias e doces com baixo teor em açúcar, especialmente dedicadas aos consumidores que se preocupam com a sua saúde e bem-estar. Neste caso, não são utilizadas pectinas HM devido ao facto de não gelificarem quando o TSS se encontra abaixo de 60%. Assim, são utilizadas pectinas com baixo grau de metilesterificação, sendo a forma amidada a mais usada, uma vez que a textura desejada é

conseguida através da formação de gel com o cálcio que existe naturalmente na fruta. Por sua vez, as formas não amidadas requerem uma adição extra de cálcio [27].

Tabela 2 - Pectinas recomendadas para diferentes tipos de produtos. Adaptado de [28].

Produto	Tipo de pectina recomendado	Função
Preparado de fruta para aplicação em iogurtes	Baixo grau de metilesterificação amidada ou não amidada	Espessante, produz um produto suave e bombeável que permite a distribuição uniforme da fruta, reduzindo a migração da cor para a fase de iogurte
Iogurtes	Alto e baixo grau de metilesterificação amidada ou não amidada	Espessante, estabilizante, criação de cremosidade
Produtos lácteos com baixa gordura	SLENDID®	Emulsionante, fornece uma sensação de paladar idêntica a da gordura
Concentrado de fruta	Alto grau de metilesterificação, gelificação rápida	Estabilização da suspensão de polpa e emulsão do óleo
Bebidas de fruta	Alto grau de metilesterificação	Espessamento e restaurar a sensação de paladar de um sumo fresco
<i>Toppings</i> de fruta	Baixo grau de metilesterificação amidada ou não amidada	Espessante
Geleias com aroma a fruta	Alto grau de metilesterificação, gelificação lenta	Gelificante
Pão	Alto grau de metilesterificação	Aumenta o volume, retém a humidade e a maciez
Massa congelada	Alto grau de metilesterificação	Aumenta o volume e a estabilidade ao frio
Carnes processadas	SLENDID®	Estabilizante e substituto de gordura

Outras aplicações

As pectinas não são só usadas na indústria alimentar. A indústria farmacêutica e de bem-estar utilizam estes polissacarídeos nas suas formulações. Nestas áreas tem-se como exemplos a aplicação de pectinas em pastas de dentes e no encapsulamento de medicamentos, permitindo que este passe ao longo do tubo digestivo [21]. Na indústria do tratamento de efluentes pode ser usada como agente descontaminante, permitindo a remoção de cationes tóxicos [26].

2.2.3.4. Legislação

As pectinas comerciais devem ter na sua constituição pelo menos 65% de ácido D-galacturónico de acordo com a diretiva No. 98/86/EC da União Europeia (UE) [31], com o *Food Chemicals Codex*, quinta edição, publicada em 2003 e com o *FAO Food and Nutrition Paper 52* em 2001 [28].

A pectina é geralmente considerada uma substância segura, uma vez que pode encontrar-se de forma natural ou adicionada no alimento. A JECFA (*Joint Food and Agriculture Organization World Health Organization Experts Committee on Food Additives*) não especificou nenhuma dose diária recomendada (ADI - *Acceptable Daily Intake*), pelo que se apresenta listada na mesma base no *Codex General Standard for Food Additives*. Na União Europeia (UE), quer a pectina não amidada quer a amidada, cujos números de aditivo alimentar são, respetivamente, E440 (i) e E440 (ii), não têm especificada nenhuma ADI pelo *Scientific Committee for Food*. As especificações estão registadas na diretiva 98/86/EC [31]. No entanto, a pectina deve ser adicionada aos alimentos sob as condições *quantum satis*, ou seja, deve ser adicionada ao alimento na quantidade suficiente para a sua confeção para que este adquira as características pretendidas. Nos Estados Unidos de América (EUA), a *Food and Drug Administration* (FDA) reconhece a pectina como GRAS (*generally recognized as safe*), podendo ser usada nos alimentos não padronizados e de acordo com o *Code of Federal Regulations* (21CFR 184.1588). Noutros países, a legislação geralmente, reconhece a pectina como uma substância segura e importante para os alimentos e os produtos devem ser preparados de acordo com “*Good manufacturing practice*” [27, 32, 33].

2.3. Reações enzimáticas - Enzimas pécticas

Os polissacarídeos pécticos são naturalmente degradados por enzimas pécticas. Estas são classificadas (Tabela 3) com base na forma como catalisam as reações que ocorrem na cadeia de homogalacturonana. São conhecidos dois tipos de enzimas pécticas: (a) as enzimas que desesterificam (pectinaesterases) e (b) as enzimas que despolimerizam (despolimerases: hidrolases e liases) [8, 34, 35].

As pectinaesterases podem ser divididas em dois grupos: as pectina metil esterases (PME) e as pectina acetil esterases (PAE). As PMEs catalisam a desesterificação dos grupos metílicos da cadeia de ácido galacturónico dando origem a pectato e metanol [34, 35], podendo ser produzidas por bactérias, fungos e plantas superiores [8]. As PMEs estão presentes em praticamente todas as

preparações comerciais de enzimas pécnicas. Estas enzimas estão envolvidas em mudanças estruturais dos polissacarídeos pécnicos durante a maturação, armazenamento e processamento [8, 36]. As PAEs hidrolisam os grupos acetilo presentes na pectina, formando pectina e acetato [37].

As despolimerases podem ser divididas em dois grupos: as hidrolases e as liases. As hidrolases clivam a ligação glicosídica (α 1 \rightarrow 4) entre os monómeros de ácido galacturónico com a introdução de uma molécula de água. Por sua vez, as liases catalisam reações de β -eliminação.

No que diz respeito às hidrolases, podem ser divididas em quatro grupos: endo e exo poligalacturonases (PG) e endo e exo polimetilgalacturonases (PMG). As PG degradam o pectato e as PMG degradam as homogalacturonanas esterificadas. A denominação destas enzimas pode ser precedida pelo prefixo “endo” ou “exo”, dependendo se clivam aleatoriamente ou se clivam a partir das extremidades não redutoras, respetivamente [34]. As PG são as enzimas pécnicas mais abundantes e também, as mais estudadas [8].

Por sua vez, as pectina liases clivam a ligação glicosídica da pectina (endo ou exo – polimetilgalacturonato liase) dando origem a um produto insaturado através de uma reação de β -eliminação [34]. As pectina liases precisam de iões de cálcio para terem atividade e são fortemente inibidas por agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) [8].

A Figura 5 descreve o modo de ação das diferentes enzimas pécnicas e quais as alterações que surgem nos alimentos quando estas enzimas atuam. Nesta figura também estão representadas as condições necessárias para ocorrerem as reações de hidrólise e β -eliminação não catalisadas por enzimas (ver tópico 2.4.).

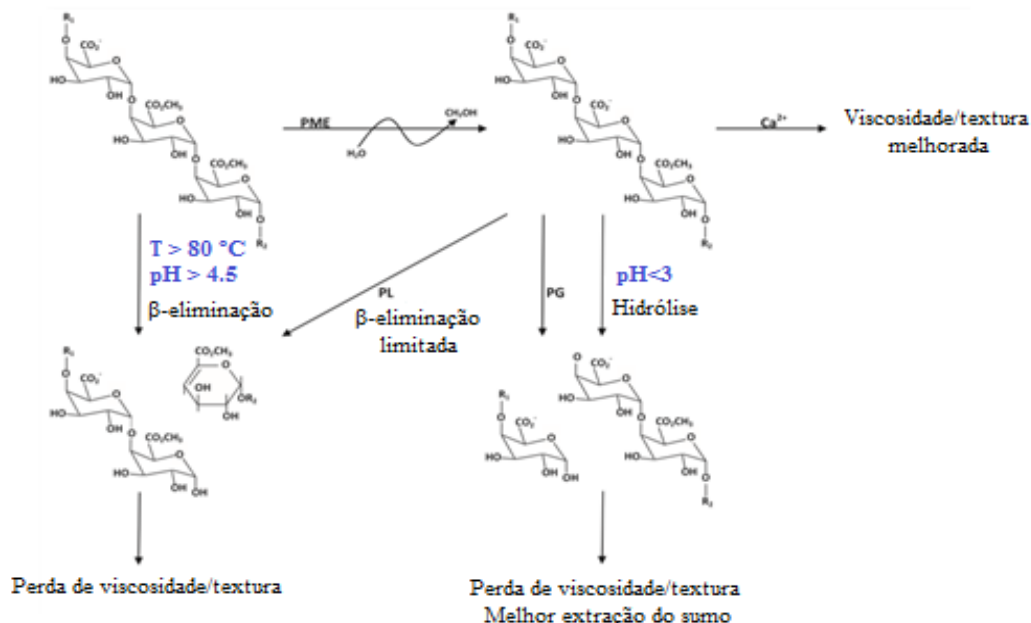


Figura 5 – Representação esquemática da pectina (só homogalacturonanas) e das reações enzimáticas e não enzimáticas que podem ocorrer (PME=Pectina Metil Esterase; Ca^{2+} =Ligações cruzadas de cálcio; PG=Poligalacturonase; PL=Pectina liase; T=Temperatura; R1/R2= Fragmento inicial e final do polímero de pectina, respetivamente. Adaptada de [38].

2.3.1. Aplicações comerciais

As enzimas pécticas foram as primeiras enzimas a serem usadas em produtos alimentares. A primeira utilização comercial remonta a 1930, com a aplicação destas em sumos de frutas e vinho [7]. Na maior parte das preparações comerciais, as enzimas pécticas são obtidas a partir de fungos. As estirpes mais usadas pertencem ao género *Aspergillus*, sendo o fungo *Aspergillus niger*, a espécie mais utilizada na produção industrial de enzimas pécticas. As enzimas pécticas são responsáveis por 25% das vendas anuais de enzimas alimentares [8]. Na indústria alimentar são muitas as aplicações das preparações comerciais destas enzimas, seguindo-se uma breve descrição de algumas dessas aplicações:

Extração e clarificação de sumos de fruta: As pectinas contribuem para a viscosidade dos sumos de fruta e para a diminuição da turbidez. Uma mistura de pectinases e amilases é usada na clarificação do sumo, ajudando a diminuir o tempo de filtração. O tratamento das polpas de fruta com pectinases, xilanases e celulasas permite obter um maior volume de sumo a partir de bananas, uvas e maçã, do que um tratamento só com pectinases [39]. Assim, as enzimas pécticas em combinação com outras enzimas, tais como celulasas, arabinanases e xilanases têm sido usadas para aumentar a eficiência na extração de sumo das frutas [40].

Fermentação do café e do chá: O tratamento com pectinases acelera a fermentação do chá e destrói a turvação existente nos chás instantâneos em pó. Estas enzimas são usadas na fermentação do café para remover mucilagens do grão do café [8].

Melhorar a cor e estabilidade dos vinhos tintos: As enzimas pécticas são adicionadas na etapa de maceração dos frutos antes da adição das leveduras que fermentam o vinho, melhorando as características visuais (cor e turbidez) quando comparado com um vinho não tratado com enzimas pécticas. Estes vinhos também mostram uma maior estabilidade durante dois anos em garrafa [41].

Para além da indústria alimentar, existem outras indústrias a usar este tipo de enzimas, destacando-se o processamento de têxteis, biolavagem de fibras de algodão, alimentação animal, tratamento de águas, entre outras [8, 39].

A enzima usada neste trabalho é a pectina metil esterase (PME). Segue-se uma breve descrição acerca desta enzima.

2.3.2. Pectina Metil Esterase

Comercialmente, a PME é usada para melhorar a textura e a firmeza de muitos frutos e vegetais processados e também é utilizada na extração e clarificação de sumos de fruta [42].

A pectina metil esterase (EC 3.1.1.11) catalisa a desesterificação do grupo metílico das homogalacturonanas, formado ácido péctico e metanol [34, 35]. O ácido péctico resultante sofre a ação das poligalacturonases [43], uma vez que estas enzimas precisam do substrato desesterificado para exercerem a sua função. O modo de ação varia de acordo com a sua origem. Assim, a PME produzida por fungos atua por um mecanismo de multi-cadeia, removendo grupos metílicos ao acaso. Por sua vez, a PME produzida pelas plantas atua preferencialmente numa extremidade não redutora, ou numa unidade de ácido galacturónico esterificado ao lado de uma unidade desesterificada e continua ao longo da molécula por um mecanismo de cadeia única [8]. Quando as PMEs atuam aleatoriamente nas homogalacturonanas, a metil desesterificação liberta protões, o que vai promover a atividade das endopoligalacturonases, e contribuir para a perda da firmeza da parede celular. Por sua vez, quando as PMEs atuam linearmente, este modo de ação origina grupos carboxílicos livres que podem interagir com os iões de cálcio e formar pectato de cálcio. Quando as pectinas estão na forma de pectato de cálcio, a ação da endopoligalacturonase é limitada, logo a ação da PME contribui para o endurecimento da célula [18]. A reação catalisada pela PME está representada na Figura 6.

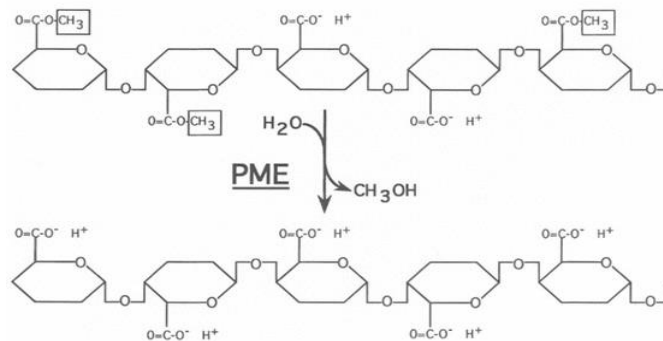


Figura 6 – Reação catalisada pela Pectina Metil Esterase. Adaptada de [44].

A PME pode ser encontrada em plantas, bactérias que infetam plantas e fungos [45]. As PMEs provenientes de diferentes fontes têm diferentes características, podendo ser encontradas na mesma fonte duas ou mais isoenzimas com diferentes pesos moleculares, pontos isoelétricos e/ou propriedades cinéticas. A maior parte das PMEs com origem nos eucariotas são glicoproteínas [44]. A PME é uma proteína com conformação em hélice- β , que é caracterizada por elementos secundários de folhas β paralelas enroladas num grande cilindro (*right handed*) e por um *loop* constituído por uma hélice- α [19]. O peso molecular da maior parte das PMEs varia entre 35 e 50 kDa [8].

Nas plantas, a PME está ligada à parede celular por interações electroestáticas. Portanto, a sua extração pode ser realizada utilizando soluções com elevada força iónica, ou por aumento do pH de forma a tornar-se mais alcalino [46]. A produção de PME fúngicas é realizada através do cultivo da espécie de fungo responsável pela sua produção, sendo esta afetada pela estirpe, composição do meio de crescimento e condições de cultivo (aeração, pH, temperatura, agitação e tempo de incubação) [47].

A atividade da PME *in vivo* está relacionada com o metabolismo da parede celular, incluindo o crescimento celular, amadurecimento dos frutos, abscisão, senescência e patogenicidade [19, 48, 49]. A sua atividade é mais elevada quando a pectina tem um grau de metilesterificação entre 65 e 75%, desde que existam unidades de ácido galacturónico adjacentes desesterificadas [50], as pectinas muito metilesterificadas podem inibir a ação da PME. Estas enzimas caracterizam-se por serem altamente específicas. Tal como as outras enzimas, a PME tem atividade ótima em determinadas condições. Estas condições variam consoante a fonte da qual a enzima é proveniente [51]. Assim, o ponto isoelétrico (pI) das PMEs varia entre 3,1 nos fungos até 11 no tomate. A maioria das PMEs purificadas a partir de plantas tem pI neutro ou alcalino, apenas algumas tem pI

ácido [44]. O pH ótimo destas enzimas varia entre 3 e 8, sendo que as PME's produzidas por fungos têm um pH ótimo mais baixo do que as produzidas por bactérias. Nos fungos, o pH ótimo encontra-se entre 3 e 6 e nas plantas entre 6 e 8 [8]. O padrão de ação da PME varia com o pH. Assim, algumas isoformas atuam aleatoriamente em pH ácido, porém em pH alcalino atuam linearmente [19]. A atividade da PME é maior com o aumento da concentração de cátions até um valor ideal, a partir do qual a atividade diminui geralmente [44]. Os cátions mais efetivos são os trivalentes, por sua vez os bivalentes são mais efetivos que os monovalentes [52]. Dependendo da concentração, os cátions podem também modificar a afinidade da PME para com o substrato. A temperatura ótima destas enzimas encontra-se num intervalo entre 40 e 50 ° C [8].

As PME são normalmente termolábeis pelo que são inativadas a temperaturas superiores a 70 ° C. A sua estabilidade térmica depende do ambiente em que está inserida, por exemplo, num sistema tampão, sumo ou tecido [46]. Uma PME é menos suscetível ao aquecimento quando está inserida num tecido e a sua estabilidade é aumentada através da adição de açúcares ou polióis [53].

2.3.3. Legislação

A União Europeia define as enzimas alimentares como um produto obtido a partir de plantas, animais, microrganismos ou produtos derivados, incluindo produtos obtidos por processos de fermentação usando microrganismos. No que diz respeito à utilização de enzimas alimentares, a UE estabelece que quando se usa enzimas como aditivos em alimentos, estas não devem por em causa a saúde do consumidor, devem ser tecnologicamente necessárias durante as fases de manufatura, processamento, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento dos alimentos e, por fim, a sua utilização não deve induzir o consumidor em erro. O regulamento europeu relativo às enzimas alimentares é o Regulamento (EC) No. 1332/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho [54] e as condições de rotulagem da adição de enzimas estão descritas no Regulamento (EC) No. 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho [55]. No caso da enzima ser produzida ou extraída de um organismo geneticamente modificado (OGM), o produto tem que ser devidamente rotulado, tendo em consideração o artigo 12 do Regulamento (EC) No. 1829/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho [56]. Especificando, as pectinases estão abrangidas pelo artigo 8 do Regulamento (UE) No. 234/2011 da Comissão [57]. A UE considera como pectinases, as seguintes enzimas: a pectina liase (EC 4.2.2.10), a pectina metil esterase (EC 3.1.1.11) e a poligalacturonase (EC 3.2.1.15) produzidas a partir do fungo *Aspergillus niger* [58].

2.4. Reações não enzimáticas que ocorrem durante o processamento de alimentos de origem vegetal

Maioritariamente, assume-se que as enzimas são responsáveis pelas alterações químicas que ocorrem no tecido das plantas. Por vezes, as reações ocorrem sem a necessidade da presença de uma enzima a catalisar a reação. As reações não enzimáticas de β -eliminação e hidrólise ácida irão ocorrer durante o armazenamento da fruta, após a colheita e seu processamento, podendo afetar as propriedades do produto final.

Os preparados de fruta, bem como outros alimentos da indústria alimentar com alguns ingredientes de origem vegetal, têm uma etapa de processamento térmico (pasteurização térmica). Esta etapa tem como objetivo a cozedura do produto e inativação de enzimas e de microrganismos. No entanto, o processamento pode fornecer as condições necessárias para que haja degradação e perda de funcionalidade dos polissacarídeos pécnicos por mecanismos não enzimáticos [38].

Durante o processamento térmico, os polissacarídeos pécnicos sofrem predominantemente mudanças no grau de polimerização, sendo estas mudanças explicadas pelas reações de β -eliminação. Estas podem ser promovidas pelo elevado teor em ésteres de metilo, aumento da temperatura e do pH, e pela presença de sais monovalentes, fitatos, malatos, citratos, entre outros. As temperaturas superiores a 80 ° C, as pectinas tornam-se mais suscetíveis às reações de β -eliminação. [38]. Um segundo mecanismo de degradação durante o processamento térmico é a hidrólise ácida ($\text{pH} < 3,0$). Em condições ácidas, as HG com baixo grau de metilesterificação hidrolisam rapidamente, e a reação é impulsionada pela metil desesterificação química que ocorre simultaneamente sob tais condições [38].

As reações não enzimáticas, sejam estas de β -eliminação ou de hidrólise ácida, provocam a diminuição significativa da viscosidade do gel e do peso molecular dos polissacarídeos pécnicos, existindo um aumento na solubilidade destes [38]. A Figura 5 mostra as reações não enzimáticas das pectinas que ocorrem durante o processamento.

2.5. Amadurecimento dos frutos

O amadurecimento dos frutos é coordenado e geneticamente programado, permitindo o desenvolvimento de frutos com a qualidade desejada, incluindo a textura, a cor atrativa, o aroma e o sabor agradáveis, e de vários fitoquímicos que promovem a saúde dos tecidos vegetais. Este processo irreversível envolve uma série de mudanças moleculares, bioquímicas e fisiológicas [59].

As frutas podem ser classificadas como frutas não-climatéricas e climatéricas. Esta classificação é baseada no padrão de respiração e no papel que o etileno desempenha na maturação [60]. As frutas não-climatéricas tais como, morango, ananás, uvas e citrinos, produzem baixos níveis de etileno durante a maturação, sendo outras fito-hormonas mais importantes neste processo como a auxina. Por sua vez, as frutas climatéricas, tais como, alperce, pêssago, framboesa, tomate e banana, produzem altos níveis de etileno que promove drasticamente o amadurecimento do fruto, apresentando ao mesmo tempo um aumento da taxa de respiração. Assim, o processo de maturação é regulado predominantemente pelo etileno [59-61].

A maturação tem efeitos positivos como a transmissão de um sabor desejável, cor e textura (características de qualidade da fruta), e fornecimento de hidratos de carbono, ácidos orgânicos, fibra, vitaminas, lípidos e minerais (características nutricionais), enquanto que os efeitos negativos podem ser sumariados como sendo a perda de peso e de firmeza e maior suscetibilidade a microrganismos patogénicos [62]. Tanto as reações enzimáticas como as reações não enzimáticas contribuem para o amadurecimento. Além disso, frutas diferentes amadurecem a diferentes taxas e o grau de amadurecimento varia com a sua composição inerente, como por exemplo, os polissacarídeos presentes na sua parede celular e em que proporções se encontram [59].

A perda de firmeza e outras alterações na textura dos frutos durante a maturação são consequências progressivas da despolimerização, solubilização dos componentes da parede celular e a perda de estrutura celular [59]. As classes de polissacarídeos que sofrem mais alterações durante o amadurecimento são os polissacarídeos pécnicos, celulose e hemicelulose [14]. Nos polissacarídeos pécnicos, juntamente com a solubilização, ocorre a perda de açúcares neutros das cadeias laterais [63]. Assim, quando o fruto está maduro, os polissacarídeos pécnicos apresentam um baixo grau de esterificação, baixo peso molecular e uma diminuição dos açúcares neutros quando comparado com o fruto verde [14].

Mais recentemente, tem-se afirmado que a despolimerização não ocorre apenas através de reações enzimáticas, podendo ocorrer também através de reações não enzimáticas, modificando os componentes da parede celular. A permeabilização da membrana ocorre na fase inicial de maturação do fruto, permitindo libertar ascorbato no apoplasto, onde pode desencadear a produção do radical hidroxilo via reação de *Fenton*. Este radical está possivelmente envolvido nas reações não enzimáticas de cisão dos polissacarídeos da parede celular [63].

A composição qualitativa e quantitativa de ácidos orgânicos e açúcares solúveis é um indicador da qualidade dos frutos. Estes compostos são importantes também para avaliar a maturação da fruta, condições de maturação e armazenamento, podendo ainda ser usados para distinguir diferentes culturas [64].

Para desenvolver os preparados de fruta, utilizaram-se polpas de morango, framboesa, alperce e pêsego. Segue-se uma breve referência a estes frutos:

a) Morango

O morango (*Fragaria x ananassa* L.) é um dos frutos mais populares e valorizados em todo o mundo, devido às suas características organoléticas, bem como propriedades nutricionais e consequentes benefícios para a saúde. Os morangos costumam ser consumidos frescos, ou então, como ingredientes em várias preparações alimentares, como por exemplo, produtos lácteos, compotas e bolos. As características mais marcantes no morango são a sua cor vermelho viva, o seu aroma e o seu sabor doce natural, sendo normalmente classificados como uma agradável experiência sensorial. Esta fruta também é caracterizada por ser muito mole e de textura frágil, tendendo a desintegrar-se quando incorporada em alimentos, tais como, os iogurtes, gelados e outros produtos processados. Este fruto pertence à família *Rosaceae* e o seu género *Fragaria*, vastamente cultivados nas regiões temperadas existentes no planeta Terra. [65].

Durante o amadurecimento ocorrem vários eventos bioquímicos que resultam em importantes mudanças que afetam a qualidade da fruta, incluindo a acumulação de pigmentos vermelhos (antocianinas), perda da estrutura da parede celular causando o amolecimento, aumento do teor em sacarose e em hexoses [65]. A perda de firmeza durante a maturação determina a qualidade do fruto e o seu tempo de prateleira [66], e resulta da atividade de enzimas hidrolíticas, tais como pectina liase, poligalacturonase e pectina metil esterase, sendo que durante a maturação está ausente ou é pouco expressa. Draye & Cutsem [67] relatam que o máximo de atividade da PME ocorre quando a fruta está verde. À medida que o fruto amadurece existe uma diminuição da atividade da enzima, registando o mínimo na fase de senescência do fruto.

A perda de firmeza referida anteriormente está relacionada com a degradação da lamela média das células do parênquima cortical. Consequentemente, a parede celular da fruta madura é mais fina do que quando a fruta está verde. Os componentes pécticos da parede celular são os que sofrem as maiores mudanças durante o amadurecimento. A percentagem de pectina solúvel em água aumenta durante a maturação do fruto, e a quantidade total de resíduos e o comprimento das

cadeias poliméricas de ácido galacturónico sofrem uma leve modificação, em concordância com o facto da poligalacturonase ter baixa atividade no fruto maduro [68, 69].

O desenvolvimento e amadurecimento das frutas não climatéricas é controlado pela hormona auxina. O etileno é produzido em baixas quantidades, no entanto, durante o desenvolvimento da fruta, a transcrição dos genes responsáveis pela biossíntese do etileno e dos recetores para o etileno aumentam. Manning [70] demonstrou que a transcrição de novos mARN durante a maturação é controlado pela auxina. Entre estes mARN sintetizados, foram identificados três responsáveis pela síntese de PL, por sua vez, a PG parece estar ausente ou fracamente expressa durante a maturação. Assim, é sugerido que as PLs sejam um fator importante na degradação dos polissacarídeos pécticos do morango [67].

b) Framboesa

A framboesa (*Rubus idaeus* L.) é muito apreciada pelo consumidor pelo seu sabor e valor nutricional, fornecendo nutrientes e micronutrientes que contribuem para a saúde e bem-estar, em particular, a vitamina C e numerosos fitoquímicos, tais como, antocianinas, compostos fenólicos e ácido elágico, o que o torna um fruto com elevada atividade antioxidante [71]. Este fruto é oriundo da Ásia Oriental [72], sendo produzida em países como Alemanha, Turquia, EUA e Bélgica. A sua época de colheita é entre junho e agosto [73]. Este fruto tem uma forma muito peculiar, sendo um agregado de bagas que se caracteriza por ser oco no seu interior. O fruto tem várias variedades, podendo adquirir cor vermelha, a mais frequente, preta, amarela, laranja, âmbar e branca. A framboesa é mais delicada e frágil do que o morango [72].

Este fruto é classificado como climatérico, apesar de haver alguma controvérsia por apresentar um aumento na taxa de produção de etileno, porém não existe aumento na taxa de respiração [61]. Quando o fruto está verde existe uma baixa concentração de etileno, porém à medida que o amadurecimento ocorre, a concentração aumenta substancialmente [74]. O aumento da produção de etileno correlaciona-se com a redução da firmeza [61].

A framboesa é um fruto que, depois de colhido da planta-mãe, apresenta um tempo de vida relativamente pequeno quando conservado à temperatura ambiente. A perda de firmeza aumenta a suscetibilidade do fruto a ataques de agentes fúngicos patogénicos como o fungo cinzento *Botrytis cinerea* [75]. A perda de firmeza é devida à ação de duas enzimas, a PME e a PG, responsáveis pela metil desesterificação e despolimerização dos polissacarídeos pécticos, respetivamente [75].

c) Alperce

O alperce comum (*Prunus armeniaca* L.), pertence à sub-família *Prunoideae* e é um membro da família *Rosaceae* [76], existindo principalmente nas zonas mediterrâneas. Os países que apresentam uma produção maior são: a Turquia, Irão, Itália, França, Espanha, Marrocos e Estados Unidos da América. Mais de 80% da produção de alperce está confinada à área mediterrânea e a sua colheita feita maioritariamente em junho por um período de 30 a 40 dias [71]. O tempo de prateleira do alperce é muito curto, podendo ser armazenados a 0 ° C durante 1 a 2 semanas depois da colheita [77].

As características do alperce dependem dos atributos físicos, fisiológicos e bioquímicos tais como, firmeza, cor, produção de etileno, taxa de respiração, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e voláteis [77]. O alperce é considerado um dos mais deliciosos frutos de árvores características de zonas temperadas. É uma fruta que tem um bom balanço entre açúcares e ácidos, cujo aroma excecional é o seu principal atributo. A sacarose é o açúcar que se encontra em maior quantidade quando o fruto está maduro [78]. Este fruto é uma excelente fonte de β -caroteno, sendo o responsável pela cor laranja do fruto [79].

A qualidade do alperce depende da variedade, da zona geográfica, fatores ambientais e da localização do fruto na árvore. O padrão oficial de qualidade do alperce é o calibre do fruto, suas propriedades físico-químicas também são importantes, tais como, o teor de sólidos solúveis (TSS) expresso em grau Brix (° Bx) e a firmeza do fruto medida com um dispositivo de *durofel* [80].

O alperce encontra-se na classe dos frutos climatéricos, que são caracterizados pelo aumento da taxa de respiração e de biossíntese do etileno durante a maturação [62]. Existe ainda, durante este período, a produção de muitos compostos voláteis, maioritariamente ésteres que contribuem para o aroma da fruta.

d) Pêssego

O pêssego (*Prunus persica* L.) pertence à família *Rosaceae*, é um fruto proveniente de uma árvore nativa da China. Os seus grandes produtores são: a Itália, EUA, China e Grécia [73]. O pêssego é relativamente próximo de alguns frutos, tais como, o alperce, amêndoa, cereja e ameixa [72]. A sua época de colheita é entre julho e setembro [73].

O pêssego pode ser classificado de duas formas: *freestone* e *clingstone*. A primeira caracteriza-se pelo caroço ser mais facilmente removido da parte carnuda do pêssego. Estes são consumidos maioritariamente frescos, todavia também podem ser processados. Por sua vez, a

segunda variedade caracteriza-se pelo caroço ser mais dificilmente removido da parte carnuda do pêssego. Esta chega ao consumidor final processada e não fresca, podendo ser vendidas em calda ou congelada [81].

O amadurecimento no pêssego é acompanhado pela conversão dos polissacarídeos pécticos insolúveis em solúveis em água, existindo uma percentagem maior de solubilização na variedade *freestone* do que *clingstone* [82]. A variedade *freestone* possui uma endo - α - galacturonase e uma exo - α - galacturonase, enquanto que a variedade *clingstone* apenas possui uma exo - α - galacturonase. Assim, a presença da endo - α - galacturonase explica o facto de existir uma maior solubilização dos polissacarídeos pécticos e um maior amolecimento na variedade *freestone*, do que na *clingstone* [82]. Embora os outros polissacarídeos também sofram mudanças durante a fase de maturação, os estudos dão sempre mais atenção à solubilização dos polissacarídeos pécticos por causa da sua ocorrência, tanto na lamela média como na parede celular primária [83]. Por norma, não é detetada a atividade da poligalacturonase quando o pêssego ainda é um fruto verde, começando a sua atividade a ser notória durante a fase de maturação [83]. Também tem sido reportada que a atividade da PME nos pêssegos decresce ao longo da maturação [84]. Outro acontecimento é a deteção de ácido galacturónico livre em maior quantidade nos pêssegos maduros o que sugere degradação dos polissacarídeos pécticos. Este fenómeno está relacionado com a atividade da exogalacturonase [83, 85].

2.6. Preparados de fruta

Os preparados de fruta são intermediários importantes para a produção de diversos produtos na indústria alimentar, tais como iogurtes, queijo fresco, gelados, produtos de panificação e de confeitaria [86, 87]. Um preparado de fruta para iogurte pode ser definido como uma suspensão estabilizada de partículas de fruta ou puré numa matriz ácida e doce, com ou sem a adição de aromas e/ou corantes. O preparado é processado termicamente para aumentar o tempo de vida do produto por destruição dos microrganismos e das enzimas presentes.

A adição de preparados, purés ou de aromas de fruta a iogurtes, potenciam o sabor, cor e textura. Geralmente, as frutas são muito apreciadas pelo consumidor, que as considera como saudáveis uma vez que as fibras solúveis e insolúveis, segundo alguns autores [6, 88, 89], presentes na fruta protegem contra doenças cardiovasculares e cancro do colón, respetivamente. Os sabores

de fruta para iogurte mais populares são o morango, framboesa, cereja, mirtilo, frutos silvestres, pêssego, banana, limão, aromas tropicais, alperce, maçã e suas combinações [81].

No desenvolvimento de um preparado deve-se ter em atenção à fruta utilizada, uma vez que esta influencia muito a qualidade do produto final. Assim, é necessário escolher os melhores cultivos que preencham todos os requisitos de integridade da fruta, bem como as exigências ao nível de sabor e aroma que irão favorecer o produto final [81].

A qualidade do fruto é determinada pela variedade, pela árvore ou arbusto onde cresce, práticas de cultivo, condições do solo e climatéricas [81, 87]. Os frutos são normalmente colhidos pelo fruticultor quando chegam a determinado grau de maturação, para garantir as suas melhores propriedades é vendido na sua forma fresca. Posteriormente, utiliza-se o *Individually Quick Frozen* (IQF) ou congelado em bloco (estático), o primeiro (IQF) permite que as frutas congeladas tenham características mais próximas das frescas, visto que a congelação rápida evita danos significativos no tecido do fruto dado que a formação de cristais de gelo é mais suave [81], conferindo a manutenção da qualidade desejada.

Na formulação de preparados de fruta, os ingredientes normalmente usados são: fruta em pedaços, polpa, puré ou em sumo, açúcar ou adoçantes, reguladores de acidez, conservantes (usualmente sorbato de potássio), corantes, aromas, estabilizantes e espessantes, muitas vezes é usado amido modificado ou pectinas. Os preparados de fruta podem ser ainda um veículo para a incorporação de vitaminas, minerais, ingredientes funcionais tais como fibras, nutracêuticos, entre outros [81].

O processo de fabrico dos preparados de fruta divide-se em cinco etapas principais: ingredientação, processamento (que inclui o arrefecimento do preparado, se aplicável, até à temperatura ambiente), embalagem, controlo de qualidade e distribuição. A ingredientação ocorre no *pré-mix* e consiste na mistura da fruta com os restantes ingredientes. Na etapa de processamento, procede-se à pasteurização térmica do mesmo, cujo principal objetivo é a cozedura dos ingredientes (por exemplo, amidos) de forma a conferir textura ao preparado e a destruição de microrganismos e a inativação de enzimas. Por norma, o binómio temperatura e tempo utilizado encontra-se no intervalo de 85 ° C e 95 ° C por cinco a dez minutos. O aquecimento permite que o preparado adquira a textura desejada. No final, o arrefecimento deve ser rápido para que a cor viva da fruta se mantenha e não haja o desenvolvimento de aromas desagradáveis. Segue-se a etapa de embalagem do produto em contentores realizado por norma, em condições de assepsia para

evitar contaminações [81]. Posteriormente, o preparado de fruta é submetido a um controlo de qualidade rigoroso que determina se este cumpre as especificações necessárias (microbiológicas, físico-químicas, organoléticas) para ser transportada, por exemplo, até às indústrias iogurteiras. Este controlo de qualidade consiste na caracterização físico-química do preparado a nível do teor de sólidos solúveis (TSS), pH e resistência ao escoamento (viscosidade cenco (cm) - *Bostwick*). Também, existe a realização de análises microbiológicas e provas organoléticas. A Figura 7 descreve o processo industrial contínuo de confeção de um preparado de fruta.

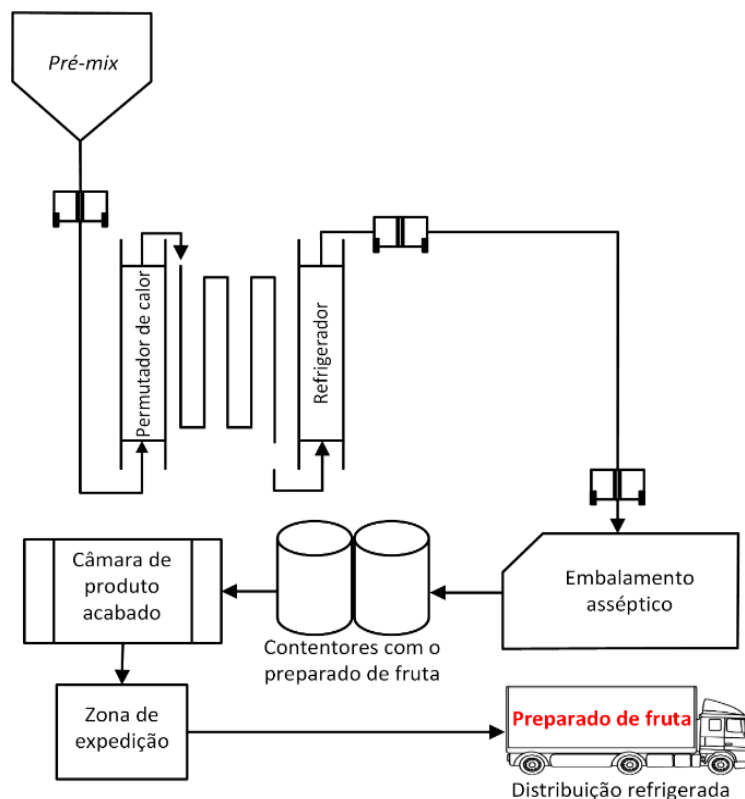


Figura 7 – Processo industrial contínuo de confeção de um preparado de fruta.

2.6.1. Reologia dos preparados de fruta

Na indústria alimentar, o estudo da reologia dos alimentos é muito importante no fabrico e processamento dos mesmos. Uma vez que as características reológicas de um produto podem levar a sua aceitabilidade por parte do consumidor dado que estas influenciam as suas propriedades sensoriais. Desta forma, o estudo da viscosidade dos produtos alimentares é importante para a validação da sua textura e outras características sensoriais, tais como a aparência. O seu estudo deve ocorrer ao longo de todas as etapas de produção de um preparado de fruta até à sua aplicação

em iogurte, não descurando as etapas de transporte e armazenamento. Durante a sua produção, estes preparados são, geralmente, bombeados, agitados mecanicamente, sujeitos a variações de temperatura, entre outros. Todos fatores/variações afetam as propriedades reológicas do produto final [90].

A viscosidade é uma medida de resistência ao movimento/escoamento (fluxo) quando uma tensão de corte é estabelecida, podendo existir fluidos que se movimentam com maior facilidade (menos viscosos) do que outros (mais viscosos). Esta é afetada por diversos fatores: temperatura, concentração e peso molecular do soluto, pH, pressão e matéria suspensa. À medida que a temperatura desce, a viscosidade tende a aumentar. Considerando uma temperatura constante, a viscosidade é tanto maior quanto maior for o teor em sólidos de um fluido. Perante as mesmas condições de concentração de soluto, a viscosidade revela-se superior nos casos em que o peso molecular do mesmo é maior. Em relação à pressão a que um fluido é submetido, a viscosidade mantém-se constante no intervalo entre 0-100 atm. Como na indústria alimentar os produtos são submetidos a pressões dentro deste intervalo geralmente o efeito da pressão é desprezado. No que diz respeito à matéria suspensa, quando presente em pequena quantidade provoca um aumento pouco significativo da viscosidade de um fluido. No entanto, elevadas concentrações podem promover o aumento significativo da viscosidade devido à interação e agrupamento em partículas [91].

O fluxo dos preparados de fruta apresentam um comportamento pseudoplástico, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de corte. Isto é, durante o seu processamento, o preparado está sujeito a *stress* mecânico que promove um decréscimo da sua viscosidade. No entanto, quando sujeito a condições estáticas ou de baixo *stress*, a viscosidade do preparado aumenta [92]. Assim, no estudo da viscosidade é necessário ter em atenção as condições de *stress* mecânico a que os preparados estão sujeitos uma vez que durante o seu processamento são frequentemente bombeados ou agitados. Dependendo do produto final em que se pretende aplicar o preparado de fruta, este voltará a estar sujeito a *stress* mecânico dado que são frequentemente bombeados para o produto final.

2.7. Produção e propriedades físico-químicas do iogurte

O processo de fabrico do iogurte produz mudanças nas proteínas do leite de forma irreversível, que ocorrem através da diminuição do pH causando a desestabilização das proteínas do leite, e,

consequente, agregação. A acidificação do leite ocorre devido à presença de bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophiles*) que convertem a lactose em ácido láctico [93]. Nalguns casos também podem ser adicionados ao leite substâncias ácidas como forma de acelerar o processo de fabrico. Assim, o processo de produção do iogurte pode ser dividido em sete partes: (1) padronização do leite (por exemplo, ajuste do teor em proteína e gordura); (2) homogeneização; (3) tratamento térmico; (4) processo de fermentação; (5) pré-arrefecimento (20 ° C); (6) agitação e (7) arrefecimento (4 ° C) [93, 94].

A acidificação do leite potencia a rutura das propriedades estruturais das micelas de caseína devido à solubilização do complexo de fosfato de cálcio coloidal (CCP). As micelas de caseína são constituídas por 92% de proteína, sendo a restante percentagem correspondente a fosfato de cálcio e pequenas quantidades de magnésio, sódio, potássio e citrato. As caseínas são um grupo heterogéneo de fosfoproteínas que contêm alguns aminoácidos de serina fosforilados. Estes aminoácidos são muito importante para a estrutura das micelas de caseína dado que interligam as várias submicelas dentro da micela por complexação como o cálcio. O diâmetro das micelas varia entre 50 e 300 nm e dão ao leite desnatado uma aparência branca. As micelas de caseína são compostas por quatro tipos de proteínas: α_{s1} , α_{s2} , β e k -caseína e existem na micela num rácio de 40:10:40:10, aproximadamente. A estabilidade da micela ao calor, etanol e cálcio é geralmente descrita pela presença na superfície da micela da k -caseína que é responsável pela repulsão entre as micelas de caseína. A k -caseína é uma glicoproteína que contém uma porção hidrofílica composta por hidratos de carbono (ácido siálico) e uma porção hidrofóbica que corresponde à parte proteica. Por sua vez, as α_{s1} , α_{s2} e β -caseína localizam-se no interior das micelas. As frações de caseína no interior da micela são sensíveis aos iões cálcio e tornam-se insolúveis na presença deste elemento. Como dito anteriormente, a k -caseína não é sensível ao cálcio, mantendo assim as micelas de caseína suspensas na fase aquosa [94, 95].

Quando o pH do leite passa de 6,6 para 6,0, existe uma diminuição da carga negativa das caseínas micelares, o que resulta na diminuição da repulsão eletrostática. Nesta fase, apenas uma quantidade pequena de CCP é solubilizado, pelo que o tamanho das micelas de caseína permanece praticamente inalterado. À medida que o pH diminui e passa de 6,0 para 5,0, as cargas negativas das micelas diminuem e as ramificações da k -caseína colapsam. Isto resulta na diminuição das repulsões electrostáticas e na estabilização estérica que são responsáveis pela estabilidade das micelas de caseína no leite. Também nesta fase (pH inferior a 6), a taxa de solubilização do CPP

aumenta, o que leva ao enfraquecimento da estrutura interna das moléculas de caseína e ao aumento da repulsão eletrostática entre os resíduos de fosfoserina expostos. Quando o pH se torna próximo do ponto isoelétrico das caseínas (pH 4,6), existe a diminuição da carga negativa que origina uma diminuição das repulsões electrostática vai aumentar as interações caseína-caseína. O processo de acidificação resulta na formação de um rede 3D constituindo por agrupamentos de cadeias de caseína [94, 95].

2.8. Análise de mercado

Quando se pretende desenvolver um produto novo é muito importante efetuar um estudo de mercado, procurando analisar não só as tendências e necessidades dos consumidores, bem como criar novos produtos viáveis a serem introduzidos no mercado previamente analisado quanto à relação entre custos do seu desenvolvimento e lucro da venda. A criação e desenvolvimento a nível de produtos alimentares apresenta um grau de dificuldade, devido à saturação do mercado alimentar, e por outro lado devido às alterações da exigência do consumidor que se refletem na propensão atual do estilo de vida saudável o qual culmina na procura de produtos alimentares mais naturais, sem aditivos e minimamente processados. Face a estas tendências, é possível encontrar nas prateleiras dos supermercados, produtos *clean label*, termo usado na indústria para descrever um produto que contém no rótulo poucos ou nenhuns aditivos tais como, aromas ou conservantes artificiais e que os ingredientes sejam facilmente reconhecidos pelos consumidores.

No caso dos iogurtes, os principais objetivos focam-se em encontrar ingredientes de alto desempenho e confiáveis que sejam capazes de suportar o processamento e também ingredientes que não interfiram com o sabor delicado dos produtos lácteos. Pretende-se obter iogurtes com uma boa textura e sabor.


Um estudo realizado em 2012 menciona que as regiões com uma percentagem maior de consumo de iogurtes são a Europa (38%), seguida da Ásia e Pacífico (28%), América de Norte (15%) e do Sul (13%) e, por fim, com o menor consumo de iogurtes o Médio Oriente e a África (6%). Em 2012, também foi realizado o estudo sobre o consumo de iogurtes *per capita* em percentagem, em diferentes países do mundo, sendo o grande consumidor de iogurtes a França (21,3%), seguida pela Irlanda (13,2%), Canadá (12,4%) e Reino Unido (10,2%). Ainda constam nesta lista países onde começa a emergir o hábito do consumo de iogurte, como a China (3,4%) e a Rússia (4,4%) [96]. Em comparação com os dados apresentados num estudo *follow-up* 2010-

2014, verificou-se um ligeiro aumento no consumo de iogurtes, mantendo-se a Europa (50%) como o maior consumidor, seguida da Ásia e Pacífico (37%), por outro lado, ocorreram algumas descidas entre as quais se destacam a América do Norte (8%), o Médio Oriente e África (2%) [97].

Um estudo realizado pela DSM - *Food Specialties* ao consumo internacional de iogurtes abrangeu seis países (China, Brasil, França, EUA, Turquia e Polónia) e as pessoas inquiridas tinham idades superiores a 25 anos, num total de 6200 pessoas. Neste estudo concluiu-se que as motivações para um maior consumo iogurte são o preço baixo (46%), *clean label* (31%) e a variedade de sabores (25%). Metade dos consumidores afirmaram que estão dispostos a pagar mais 10% por um iogurte livre de aditivos artificiais (corantes, aromas e conservantes) [98].

Tendo em consideração a importância da análise de mercado é relevante a constante pesquisa sobre a concorrência, permitindo, assim, o posicionamento da empresa e dos seus produtos no mercado. Por estarmos num mercado muito competitivo tornou-se imperativo comparar os iogurtes *clean label* e ausência de aditivos existentes face ao produto que se está a desenvolver. Para tal, foi identificado um produto que se assemelha com o iogurte que se pretende obter, este produto é o *L'essentiel* da marca *pâturages*, a sua descrição encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Produto com o mesmo posicionamento de mercado do iogurte que se pretende obter.

Produto	Descrição
 <p>País de venda: França</p>	<p>L'essentiel, pâturages, gama de iogurtes com diferentes sabores (framboesa, abacaxi e maracujá e banana) que tem na sua formulação entre três a quatro ingredientes (Leite, fruta e açúcar, na formulação de banana é acrescentado concentrado de sumo de limão).</p>

3. Contextualização e objetivo do projeto

Hoje em dia, o consumidor está preocupado com a sua saúde, preferindo produtos naturais e saudáveis, e também se encontra mais informado no que diz respeito aos ingredientes apresentados nos rótulos. Perante esta alteração de comportamento por parte do consumidor para com o produto, a Frulact está a desenvolver o projeto *FruitOnly*, no qual este trabalho se encontra inserido. O objetivo principal deste projeto é criação de preparados de fruta *clean label*. No âmbito deste projeto já foram desenvolvidos vários trabalhos na empresa Frulact, segue-se uma breve descrição dos trabalhos desenvolvidos:

Alves [99] pretendia desenvolver preparados de fruta com pedaços em suspensão com o mínimo de aditivos. Com o objetivo que os preparados desenvolvidos adquirissem a textura desejada, este autor funcionalizou os polissacarídeos pécticos presentes naturalmente nas polpas de fruta, recorrendo a um auxiliar tecnológico, a PME. Alves realizou o tratamento enzimático em polpas pasteurizadas e não pasteurizadas, constatando que o tratamento enzimático não tinha efeito nas polpas pasteurizadas devido à degradação dos polissacarídeos pécticos que ocorre durante o tratamento térmico. Alves aliou ao tratamento enzimático das polpas de fruta com a adição 1% (m/m) de cloreto de cálcio (CaCl_2), observando que as polpas adquiriam um aspeto gelificado. Este autor constatou ainda que relativamente aos preparados *FruitOnly*, o preparado de morango com uma constituição de 45% de polpa funcionalizada com PME, 40% de pedaços de morango, 13% de açúcar e o restante em água e sorbato de potássio foi aquele que apresentou as características mais benéficas para a comercialização. Por sua vez, nos preparados de alperce a formulação com 20% de polpa funcionalizada com PME, 60% de pedaços de alperce e 18% de açúcar, apresentou as melhores características para a comercialização. O preparado de alperce revelou uma estabilidade dos pedaços e ausência da sinerese durante 40 dias, enquanto o preparado de morango não se mostrou estável

Neves [100] estudou na empresa Frulact a influência que o tratamento com a PME teria na firmeza dos pedaços de morango. Observou que quanto maior fosse o tratamento enzimático mais benefícios traria para a firmeza dos pedaços. Verificou que este aumento ocorre até se atingir uma firmeza máxima a partir da qual qualquer aumento de tempo deixa de ter influência. A conjugação da adição de PME exógena com a adição de cloreto de cálcio permite uma valorização do produto em termos sensoriais. Na análise sensorial, os pedaços de morango tratados revelaram ter uma

textura diferente dos pedaços de morango não tratados. Assim, os pedaços de morango tinham um aumento em termos de firmeza, dureza, crocância e elasticidade em relação aos não tratados.

Amaro [101] desenvolveu um trabalho sobre a funcionalização tecnológica do amido em matérias-primas naturais. O objetivo principal deste projeto era a manipulação da gelatinização do amido em legumes, frutos e farinhas, para que depois esta técnica fosse integrada em formulações de preparados, conferindo-lhes características reológicas e de textura adequadas.

No presente trabalho pretendia-se desenvolver um conjunto de preparados de fruta com o mínimo de ingredientes e aditivos, utilizaram-se como sabores o morango, framboesa, alperce e pêsego. Uma solução encontrada pela empresa com o intuito de substituir o papel dos compostos que têm como função conferir textura aos preparados é a funcionalização tecnológica da fruta. Neste caso, estudou-se a funcionalização dos polissacarídeos pécicos presentes naturalmente na fruta, recorrendo a um auxiliar tecnológico, a enzima Pectina Metil Esterase. No final, pretende-se que o produto permaneça estável durante 60 dias em contentor e durante 22 dias após a sua aplicação em iogurte, assegurando a reprodutibilidade e consistência dos resultados do tratamento enzimático da fruta. Com isto objetiva-se que a funcionalização da fruta ocorra sempre da mesma forma, e que o produto final tenha aceitabilidade a nível sensorial. Por fim, deseja-se que o produto adquira sabor, aparência e textura.

Numa primeira fase do projeto, transformou-se a fruta em polpa e caracterizou-se físico-quimicamente (TSS, pH, viscosidade de *Bostwick* e *Brookfield*, cor (CIELab), análise à composição em açúcares e determinação do grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécicos presentes nas polpas) de um determinado conjunto de polpas dos frutos morango, framboesa, alperce, pêsego com diferentes granulometrias (0,5, 1 e 3 mm) Para realizar estes cortes foram utilizadas duas máquinas com modo de funcionamento semelhante. Assim, para o corte de 1 mm foi utilizada uma máquina industrial e para os cortes de 0,5 e 3 mm foi utilizada uma máquina laboratorial. A segunda fase consistiu no desenvolvimento de preparados de fruta. Foram utilizados apenas quatro ingredientes: polpa de fruta, componente principal e objeto de estudo neste trabalho, açúcar, água e sorbato de potássio. Estes preparados para adquirirem a textura desejada sofreram um tratamento enzimático com a PME durante 30 min para as polpas de morango e de 60 min para as polpas de alperce e pêsego. No caso da framboesa foi estudado qual seria o tempo de tratamento mais adequado para este fruto e, para tal, realizaram-se dois tratamentos enzimáticos de 30 (F_30 min) e 60 min (F_60 min). Também os preparados foram

caracterizados físico-quimicamente (TSS, pH, viscosidade de *Bostwick* e *Brookfield*, cor (CIELab), composição em açúcares e determinação do grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécticos) ao longo do seu período de validade (60 dias). Os preparados foram incorporados em iogurte para verificar se esta base se mantinha estável ao longo do tempo. A terceira fase consistiu em relacionar a caracterização físico-química das polpas de fruta com os resultados da caracterização físico-química dos preparados de fruta de forma a encontrar soluções para os problemas que a empresa enfrenta quando pretende obter um preparado sem a adição de compostos que conferem textura.

4. Materiais e métodos

As polpas e os preparados de fruta foram desenvolvidos na empresa Frulact – Indústria Agro-alimentar, S.A., onde também foi realizada a caracterização físico-química das mesmas (TSS, pH, fluidez, viscosidade e cor (CIELab)). Por sua vez, a análise aos açúcares neutros e ácidos urónicos e a determinação do grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécticos de polpas e preparados foram realizadas na Universidade de Aveiro.

4.1. Produção de polpas de fruta e preparados de fruta

4.1.1. Preparação das polpas de fruta

Os preparados desenvolvidos no âmbito do projeto intitulado *FruitOnly* têm como ingrediente principal a polpa de fruta. Para tal, foi essencial transformar a fruta congelada proveniente de vários fornecedores em polpa utilizando os instrumentos adequados. A Tabela 4 mostra os diferentes lotes de fruta utilizados para a transformação em polpa, contendo também algumas informações facultadas pelos fornecedores da fruta, tais como a origem geográfica, a variedade, a data de colheita das frutas, o TSS e pH quando a fruta é colhida da árvore ou planta. A validade dos lotes congelados, geralmente, é de 2 anos após a colheita para fruta congelada pelo método *Individual Quick Frozen* (IQF) e para a fruta congelada pelo processo de congelamento estático é de apenas 1 ano. Esta Tabela ainda refere a denominação que cada lote vai ter ao longo do presente trabalho e os tipos de corte (granulometria) que cada lote sofrem.

Tabela 4 – Lotes de fruta utilizados para a transformação em polpa.

Descrição	Origem geográfica	Variedade	Data de colheita	TSS (° Bx)	pH	Granulometria (mm)	Modo de referência
Morango inteiro estático	Marrocos 1	Maioritariamente					
		<i>Camarosa</i> (poderá conter outras variedades)	31-03-14	8,0 ±2,0	3,50±0,30	0,5 (10)	M060_0,5 mm
			16-04-14			1 (20)	M060_1 mm
Morango IQF Cubos 10x10x10 mm	Marrocos 2	<i>Camarosa</i>	17-03-14	8,0±2,0	3,50±0,30	3 (10)	M108_3 mm
			17-03-14	8,0± 2,0	3,50±0,30	1 (20)	M109_1 mm
						3 (10)	M109_3 mm
Morango IQF Cubos 10x10x10 mm	Marrocos 3	<i>Camarosa</i>	18-03-14	8,0 ±2,0	3,50±0,30	1 (20)	M113_1 mm
						3 (10)	M113_3 mm
Framboesa IQF migalhas	Bósnia e Sérvia	<i>Willamette</i>	15-10-2013	10,0 ± 3,0	3,10± 0,30	1 (40)	F
Alperce IQF Cubos 10x10x10 mm	Grécia	<i>Bebeco</i>	14-06-14	10,0 ± 3,00	3,50 ± 0,50	1 (30)	A25_1 mm
						3 (15)	A25_3 mm
			21-06-14			1 (30)	A27_1 mm
						3 (15)	A27_3mm
Pêssego IQF Cubos 10x10x10 mm	Grécia	<i>Catherine, Andros, Evert e Fortuna</i>	17-07-2014	9,0 ± 3,0	3,60 ± 0,50	1 (30)	P_1 mm
						3 (15)	P_3 mm

¹ Foram utilizados dois lotes com datas de colheita diferentes para a transformação da polpa, estes lotes foram utilizados numa proporção 1:1.

² Os morangueiros de onde a amostra M108 é proveniente foram fortalecidos com o cálcio por via foliar.

O número entre parênteses a seguir a granulometria indica a quantidade de fruta transformada em polpa em kg.

Foram obtidas polpas de fruta com diferentes granulometrias tendo sido preparadas a nível laboratorial e industrial. Para tal, utilizaram-se duas máquinas que têm a mesma base de funcionamento, no entanto com dimensões diferentes, a mais pequena, a máquina de crivos laboratorial (Robot coupe S.N.C, fabricada em França) e a maior, a máquina de crivos industrial (Boema, fabricada em Itália). O modo de funcionamento consiste na passagem da fruta (auxiliada pelas pás do equipamento) através de um crivo. Os resíduos provenientes do corte voltaram a passar de forma a obter um melhor rendimento. Antes de ser transformada em polpa, a fruta foi previamente descongelada para poder passar na máquina de crivos. No final, as polpas cortadas ao nível industrial tinham uma granulometria de 1 mm e as polpas cortadas ao nível laboratorial tinham uma granulometria de 0,5 e 3 mm.

Após a produção da polpa de fruta, esta foi colocada em sacos individuais (≈ 3 kg de polpa por saco) e congelada para posterior utilização. O congelamento foi realizado numa câmara de congelação à temperatura de -18°C .

4.1.2. Produção de preparados de fruta *FruitOnly*

Os preparados *FruitOnly* foram formulados apenas com quatro ingredientes: polpa de fruta congelada, açúcar, água fria e sorbato de potássio. Para a produção destes preparados recorreu-se à utilização da PME como auxiliar tecnológico. A Tabela 5 indica os ingredientes e as proporções usadas para o desenvolvimento dos preparados. Foram produzidos 2,5 kg de cada preparado.

Tabela 5 – Formulação geral dos preparados *FruitOnly*.

Ingredientes - Matéria- prima	% (m/m)
Polpa de fruta congelada	85,0
Açúcar	14,0
Água fria	1,0
Sorbato de potássio	

Os preparados de fruta *FruitOnly* foram elaborados num equipamento à escala piloto denominado por Marmita com uma capacidade máxima de 15 L e com agitação mecânica. Este equipamento assemelha-se a uma panela e está desenhado para controlar a temperatura das soluções que estão no seu interior. Este controlo é feito por um fluido circulante, geralmente água, que passa entre os dois vasos que constituem a Marmita, permitindo, assim, aquecer e arrefecer as soluções.

O primeiro passo para a produção do preparado foi o descongelamento da polpa de fruta que se realiza na Marmita por aquecimento. Quando a polpa de fruta se encontrava descongelada, juntava-se o sorbato de potássio e ligava-se a agitação mecânica (14 rpm). Depois deste passo, a temperatura da polpa de fruta atingiu os 40°C , temperatura à qual foi adicionada a enzima PME dispersa em água fria. Esta enzima foi fornecida pela DSM - *Food Specialties* e a sua adição à polpa foi realizada seguindo a quantidade proposta pelo fornecedor, por quantidade de polpa usada na formulação. O tempo de tratamento das polpas com a enzima variou nalguns casos. Assim, a temperatura de 40°C foi mantida durante 30 min para os preparados de morango e framboesa e 60 min para os preparados de framboesa, alperce e pêssgo. A Marmita não tem um sensor de

temperatura, pelo que a temperatura durante o tempo de tratamento com a enzima foi controlada de 5 em 5 minutos manualmente utilizando um termómetro de álcool (não contém mercúrio). Ao final deste tempo adicionou-se o açúcar e procedeu-se à pasteurização (85 ° C durante 10 min), a partir deste momento atribui-se o nome de preparado de fruta à amostra em estudo. Após a pasteurização, o preparado foi arrefecido na Marmitta mantendo-se a agitação mecânica (14 rpm). Quando atingiu uma temperatura entre 30 e 40 ° C foi embalado em recipientes adequados com 12 cm de altura e 10 cm de diâmetro com uma capacidade máxima de 500 g e foi guardado numa câmara de refrigeração (4 ° C) durante 60 dias permanecendo em repouso até aos dias de amostragem previamente definidos.

Caracterização da PME utilizada neste trabalho: Segundo as informações da ficha técnica que acompanha o produto, esta enzima é de origem fúngica (*Aspergillus niger* não OGM), sendo o seu nome comercial é Rapidase® FP Super. A solução de enzima encontrava-se conservada em glicerol e refrigerada a 4 ° C. Nas especificações da mesma ficha era referido que a enzima se encontrava na sua forma ativa a temperaturas entre os 10-50 ° C e pH entre 3,5 a 5,5. A sua atividade ótima é registada a temperaturas entre os 40 e 45 ° C e a pH de 4,5. Ainda é referido que esta enzima tem 30% da sua atividade máxima entre 5-10 ° C e é inativada a temperaturas acima de 85 ° C. A sua atividade enzimática mínima é de 900 PEu/g. O fornecedor refere que a principal função da enzima nos preparados de fruta é melhorar a firmeza, viscosidade, estabilizar a fase dispersa da preparação e, consequentemente, melhorar as características sensoriais do produto final.

4.1.3. Produção de polpa pasteurizada e preparado sem PME (controles)

Para as amostras de morango, framboesa e alperce 25_1 mm foram realizados dois controles: ao primeiro chamou-se polpa pasteurizada uma vez que continha apenas três ingredientes (polpa de fruta congelada, água fria e sorbato de potássio) e ao segundo chamou-se preparado sem PME visto que se adicionaram todos os ingredientes do preparado (polpa de fruta congelada, açúcar, água fria e sorbato de potássio), não tendo sofrido o tratamento com a enzima. A formulação dos controles encontra-se representada na Tabela 6. Foi produzido 1 kg de polpa pasteurizada e preparado sem PME para cada amostra em estudo.

Tabela 6 – Formulação geral dos controlos: polpa pasteurizada e preparado sem PME.

Ingredientes - Matéria-prima	% (m/m)	
	Polpa pasteurizada	Preparado sem PME
Polpa de fruta congelada	85,0	85,0
Açúcar	-	14,0
Água fria	15,0	1,0
Sorbato de potássio		

Tanto a polpa pasteurizada como o preparado sem PME foram elaborados numa placa de indução, utilizando um procedimento idêntico ao utilizado para a produção dos preparados de fruta *FruitOnly*. No caso da polpa pasteurizada começou-se por descongelar a polpa de fruta por ação da temperatura. Quando esta se encontrava descongelada, juntou-se o sorbato de potássio disperso em água, seguidamente a temperatura foi elevada até 85 ° C, a qual foi mantida durante 10 minutos. No que diz respeito ao preparado sem PME, começou-se por descongelar a polpa de fruta e quando esta estava descongelada juntou-se o sorbato de potássio e a água. Seguidamente, deixou-se elevar a temperatura até aos 40 ° C, temperatura a qual se adicionou o açúcar. Em seguida, pasteurizou-se (85 ° C durante 10 minutos).

Ainda foi realizado mais um controlo, onde se utilizou uma única amostra (amostra 060 cortada a 3 mm). Este controlo consistia na realização do preparado desenvolvido no tópico 4.1.2. com uma condição de pasteurização diferente. Neste caso, aplicou-se uma temperatura de pasteurização de 95 ° C durante 5 minutos.

4.2. Caracterização físico-química de polpas e preparado de fruta

A caracterização físico-química envolve a medição de vários parâmetros em dias previamente definidos das polpas de fruta e dos preparados. Os parâmetros medidos foram o TSS, pH, fluidez, viscosidade e cor (CIELab). No que diz respeito às polpas de fruta, os parâmetros foram medidos no dia em que foram preparadas, 1 e 2 dias após a sua preparação. Para os ensaios do dia 1 e 2, as amostras foram deixadas em refrigeração (4 ° C). Foram medidos os parâmetros na polpa, depois de descongelada, uma vez que os preparados foram realizados a partir de polpa congelada. No caso dos preparados de fruta, os parâmetros foram medidos no dia 1, 7, 20, 40 e 60 dias após a produção do preparado (temperatura ambiente, 20 ° C aproximadamente). Na Universidade de Aveiro, as

polpas e preparados foram caracterizados em relação a sua composição em açúcares e grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécnicos.

4.2.1. Teor de sólidos solúveis (TSS)

O TSS foi realizado por leitura direta num refratômetro (Bellingham+Stanley Ltd, RFM732, fabricado no Reino Unido), com uma escala de 0 a 100 ° Brix (° Bx), sendo previamente calibrado com água destilada e solução de 40 ° Bx. A medição foi realizada pela adição de uma pequena porção de polpa ou preparado de fruta na lente, e o resultado foi expresso em ° Bx. Foram realizadas três réplicas para cada amostra.

4.2.2. pH

O pH foi determinado utilizando um potenciômetro (Consort C860, com fabrico na Bélgica), previamente calibrado com soluções tampão com pH 7,0; 4,0 e 1,68. As medições do pH foram efetuadas por contacto direto do potenciômetro com a amostra. Foram realizadas três réplicas para cada amostra.

4.2.3. Fluidez e viscosidade

Na indústria alimentar, as características reológicas dos alimentos têm grande importância, sendo estudadas para que o produto adquira as propriedades desejadas e no fim, este tenha aceitação por parte do consumidor final. Assim, na indústria de alimentos precisa-se da monitorização da viscosidade para controlar a qualidade das matérias-primas, avaliar o efeito das variações na formulação e garantir uma melhor consistência do produto final.

a) Consistómetro *Bostwick*

A resistência ao escoamento foi medida utilizando um consistómetro de *Bostwick* (Figura 8). Cerca de 100 mL de cada amostra foi colocada no compartimento próprio deste aparelho. O índice de *Bostwick* é expresso pela distância (cm) que a amostra percorre em 60 segundos após a abertura da comporta do compartimento onde se encontra a amostra. O consistómetro apresenta uma escala de 0 a 24 cm, tendo um erro associado de ± 2 cm. Para todas as amostras foram realizadas medições em triplicado.

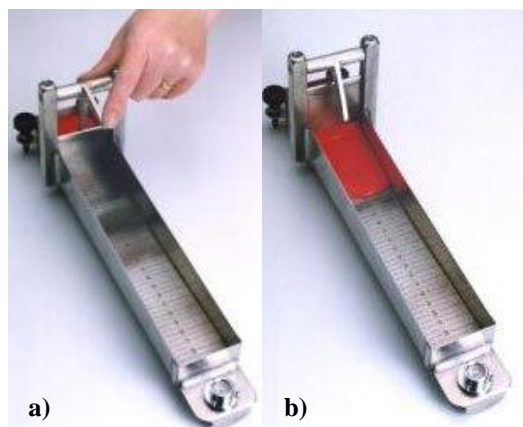


Figura 8 – Consistómetro de *Bostwick*: a) compartimento fechado, com a amostra e b) compartimento aberto, com a amostra, permitindo que esta escoe ao longo do consistómetro [102].

b) Viscosímetro de *Brookfield*

As leituras foram realizadas num viscosímetro rotacional digital (*Brookfield DV-II + Pro*, com fabrico nos USA, Figura 9). Este equipamento é constituído por um conjunto de 7 sondas (*spindle*) que são escolhidas conforme a sua adequação para com a amostra em estudo. A sonda utilizada foi a 4, uma vez que era a que se adequava melhor às amostras em estudo, tendo em consideração a fluidez das amostras. Para uma leitura correta, a sonda deve ser introduzida no centro do frasco sem tocar nas paredes nem na base do mesmo. O período de rotação selecionado foi de um minuto e a sonda apresentava uma velocidade de rotação de 20 rpm. Foram realizadas três réplicas para cada amostra.



Figura 9 –Viscosímetro de *Brookfield* [103].

4.2.4. Cor (CIELab)

A cor das polpas e dos preparados de fruta foi medida utilizando o colorímetro Konika Minolta CR-400 (Osaka, fabricado no Japão) com o iluminante D65 e um observador 2, calibrado previamente com uma placa branca padrão segundo as instruções do fabricante. Os valores obtidos pertencem ao espaço de cor CIELab proposto pela *Commission internationale de l'éclairage*, com a dimensão do L^* para luminosidade e a^* e b^* são as coordenadas de cromaticidade, indicando a direção da cor. Assim, $+a^*$ corresponde à direção do vermelho e $-a^*$ corresponde à direção do verde. Por sua vez, o $+b^*$ corresponde à direção do amarelo e $-b^*$ corresponde azul. O colorímetro ainda fornece os valores de C (croma) e de h° (ângulo de tonalidade). Foi ainda calculado o ΔE pela seguinte fórmula: $\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$. O ΔE indica se as alterações ocorridas na cor que são detetadas pelo olho humano. Este parâmetro é importante uma vez que indica se o alimento durante o seu armazenamento apresenta mudanças na cor, perceptíveis pelo consumidor final. Assim, quando o $\Delta E > 3$ as mudanças de cor são visíveis pelo olho humano. Por sua vez, quando é inferior a 3 as mudanças na cor não são detetadas [104].

4.2.5. Análise dos polissacarídeos pécticos

4.2.5.1. Preparação de resíduos insolúveis em álcool (AIR) e extrações sequenciais dos AIRs com água e imidazol

a) Determinação da matéria seca

Pesaram-se 10 g de cada amostra para um porta-amostra de peso conhecido. Seguidamente, as amostras foram congeladas e colocadas no liofilizador (Vitrís® – BenchTop™ K, com fabrico nos EUA). Após a liofilização o porta-amostras com a amostra em estudo foi pesado de forma a determinar a matéria seca.

b) Preparação dos Resíduo insolúveis em álcool (AIR)

Cada polpa (40 a 60 g) foi dissolvida e aquecida em etanol com uma concentração final de 85 % (v/v) e deixou-se ferver durante 10 minutos. No final deste tempo a amostra arrefeceu e filtrou-se em vácuo num funil de placa porosa. O resíduo obtido foi disperso em etanol e fervido durante 10 minutos, arrefecido e filtrado em vácuo. O produto obtido após a segunda filtração foi lavado duas vezes com etanol e filtrado. Seguiram-se duas lavagens com acetona, seguidas de filtração. O resíduo final foi deixado a secar à temperatura ambiente numa caixa de *petri*. A amostra seca

deu-se o nome de resíduo insolúvel em álcool (AIR), tendo sido guardada e colocada num exsiccador para análises futuras.

c) Extrações sequenciais dos AIRs

A extração dos polissacarídeos pécticos foi realizada de acordo com o método descrito por Nunes *et al.* [105]. Este procedimento foi realizado apenas para as amostras de morango do lote 060 (1, 0,5 e 3 mm). Os polissacarídeos pécticos foram extraídos sequencialmente a partir de 400 mg de AIR com água e imidazol utilizando as seguintes condições, sob agitação magnética constante: (1) água (30 mL) durante 6 h à temperatura ambiente; (2) água (25 mL) durante 30 min à temperatura ambiente; (3) 0,5 M imidazol/HCl pH 7,0 (30 mL) durante 16 h à temperatura ambiente e (4) 0,5 M imidazol/HCl pH 7,0 (25 mL) durante 2 h à temperatura ambiente. A seguir a cada extração os polímeros solubilizados foram separados do resíduo insolúvel por centrifugação (24400g durante 10 min à temperatura de 4 ° C) seguida nalguns casos de uma filtração passando o sobrenadante através dum filtro de fibra de vidro com um *cut-off* de 12-14 kDa (Whatman GF/C). Seguidamente, os extratos foram dialisados. Após este passo foram centrifugados (24400g durante 10 min à temperatura de 4 ° C) e o sobrenadante foi guardado num porta-amostras, sendo congelado e liofilizado.

4.2.5.2. Análise de açúcares

a) Hidrólise

A cada tubo de cultura (\approx 10 mL) com 2-3 mg de amostra (AIR ou extratos de água e imidazol) adicionaram-se 200 μ L de ácido sulfúrico a 72% (H₂SO₄) para a etapa de pré-hidrólise. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 3 horas e foram agitados durante este tempo 2 a 3 vezes no *vortex*. A hidrólise ocorreu com a adição de 2,2 mL de água destilada de forma a obter no final uma concentração de 1 M de H₂SO₄. Seguidamente, os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 100 ° C durante 2,5 h. Após 1 h, colocaram-se os tubos a arrefecer num banho de água e retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada hidrolisado para análise de ácidos urónicos, continuando-se a hidrólise durante mais 1,5 h para análise dos açúcares neutros. Os tubos foram arrefecidos num banho de gelo. Todas as amostras foram preparadas em duplicado.

b) Análise de açúcares neutros

Os seguintes passos foram realizados para ocorrer a redução e acetilação dos monossacarídeos a acetatos de alditol. Ao hidrolisado anterior foram adicionados 200 μ L de padrão interno (2-

desoxiglucose, 1 mg/mL). Foi transferido para novos tubos de cultura 1,0 mL, e neutralizou-se com 200 µL de amoníaco (NH₃) a 25%. Verificou-se se o pH não ficou abaixo de 7, utilizando um papel indicador de pH, no caso deste se encontrar abaixo do valor de referência, adicionar mais NH₃ a 25%. A redução dos monossacarídeos foi realizada pela adição de 100 µL de boroidreto de sódio (NaBH₄), a 15% (m/v) em 3M NH₃, a solução de NaBH₄ deve ser preparada imediatamente antes da adição. Seguidamente, colocaram-se os tubos num bloco de aquecimento a 30 ° C durante 1 h. Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e adicionaram-se duas vezes 50 µL de ácido acético glacial com a propósito de eliminar o excesso de BH₄⁻.

Para a reação de acetilação transferiram-se 300 µL de cada solução amostra para tubos de *soviel* com tampas de *teflon*. De seguida, colocaram-se num banho frio e adicionaram-se 450 µL de 1-metilimidazol (catalisador da reação) e 3 mL de anidrido acético (promove a acetilação dos alditóis a acetatos de alditol). Agitou-se bem e incubou-se num bloco de aquecimento a 30 ° C durante 30 minutos. Os tubos foram colocados num banho de gelo e adicionaram-se 3,0 mL de água destilada para decompor o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano. Agitou-se manualmente para extrair os acetatos de alditol . Posteriormente, centrifugou-se durante 30 segundos a 3000 rpm para haver separação de fases, ficando os acetatos de alditol na fase orgânica. A fase aquosa foi aspirada por sucção com uma pipeta de *Pasteur*. Repetiu-se o passo anterior, adicionando a cada tubo 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, agitou-se, centrifugou-se e aspirou-se a fase aquosa. Ainda se realizaram mais duas lavagens adicionando 3 mL de água destilada, repetindo de novo os passos de agitação, centrifugação e aspiração da fase aquosa. Na última lavagem com água destilada foi tida uma especial atenção para remover toda a água existente nas paredes do tubo. Em seguida, a fase orgânica foi transferida para tubos de *speedvac* e evaporou-se o diclorometano no aparelho de *speedvac*. Adicionou-se 1 mL de acetona anidra e evaporou-se como descrito anteriormente. Repetiu-se de novo este passo, adicionando a cada tubo 1 mL de acetona anidra e evaporou-se de novo no *speedvac*.

As amostras foram analisadas por GC-FID. Para tal, dissolveram-se os acetatos de alditol em 50 µL de acetona anidra, sendo depois as amostras injetadas no cromatógrafo (V_{injeção}=2 µL) . Neste caso, foi utilizado um Cromatógrafo de Perkin Elmer – Claus 400 equipado com uma coluna capilar DB-225 (J&W Scientific) com as seguintes características: 30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro e 0,15 µm de espessura. O programa de temperaturas do forno utilizado foi: a temperatura inicial do forno de 200 ° C, subiu a uma taxa de 40 ° C min⁻¹ até aos 220 ° C, mantendo-se a

temperatura de 220 ° C durante 7 min. Seguidamente, a temperatura subiu 20 ° C min⁻¹ até aos 230 ° C, mantendo-se esta temperatura durante 1 min. A temperatura do injetor e do detetor foram de 220 ° C e 230 ° C, respetivamente. O fluxo de hidrogénio foi de 1 mL min⁻¹.

c) Análise de ácidos urónicos

Os ácidos urónicos foram quantificados pelo método colorimétrico descrito por Blumenkrantz & Asboe-Hansen [106]. Assim, construiu-se a curva de calibração, preparando cinco padrões com as seguintes concentrações: 0, 20, 40, 60 e 80 µg/ mL de ácido galacturónico. Os padrões foram preparados a partir de uma solução de ácido galacturónico com uma concentração de 200 µg/mL, previamente elaborada. Para cada concentração foram utilizados 3 tubos (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de solução padrão. As alíquotas de 0,5 mL de amostra retiradas durante a etapa de hidrólise dos polissacarídeos (ponto a) no tópico 4.2.5.2) foram diluídas com 3 mL de água destilada. Depois da diluição foi retirado para cada tubo de ensaio 0,5 mL da solução de amostra (1 branco e 2 réplicas). A todos os tubos (amostras e padrões), colocados num banho de gelo, foram adicionados 3 mL de borato de sódio 12,5 mM preparado com ácido sulfúrico concentrado. Agitaram-se bem e taparam-se os tubos com uma folha de alumínio. Em seguida, colocaram-se os tubos num banho a 100 ° C durante 10 minutos. Arrefeceram-se os tubos num banho de gelo. Depois, adicionaram-se, no escuro, 100 µL de m-fenilfenol (MFF, 0,15 % (m/v) em 0,5 (m/v) NaOH) a dois dos três tubos de cada amostra e padrão, sendo o tubo sem adição de MFF o branco de cada amostra. Agitaram-se até não existir alteração ao nível da cor e colocaram-se os tubos no escuro para reagir durante 30 minutos. Seguidamente, os tubos foram agitados manualmente para homogeneizar a solução. Por fim, foram determinadas as absorvâncias usando um equipamento de leitura de placas (Absorvance Microplate Reader Biotek EON™, com fabrico nos EUA). A absorvância foi lida num comprimento de onda de 520 nm e à temperatura de aproximadamente 26 ° C.

4.2.6. Determinação do grau de metilesterificação

O grau de metilesterificação foi determinado pela técnica de Head Space - Solid Phase Microextraction (HS – SPME) tal como foi descrito por Nunes *et al.* [13].

Pesaram-se 2-4 mg dos extratos de água e imidazol para um *vial* de, aproximadamente, 9 mL. Seguidamente dispersou-se a amostra em 2,4 mL de água destilada. Os *vials* foram colocados num banho de água à temperatura ambiente com a finalidade de serem submetidos a ultrassons durante

10 minutos. A reação de saponificação dos polissacáridos ocorreu pela adição de 0,8 mL de 2 M hidróxido de sódio (NaOH) e o tempo de reação foi de 1 h a 25 ° C. A reação foi parada pela adição de 0,8 mL de 2 M ácido clorídrico (HCl) e ajustou-se o pH a 2. Os *vials* com uma tampa *teflon* foram colocados num banho termostatizado a 40 ° C com agitação magnética constante. Após 15 min, a fibra de SPME tripla (DVB/Carboxeno/PDMS) foi inserida manualmente através da tampa de *teflon* e foi exposta no espaço de cabeça do *vial* durante 30 min a 40 ° C. Esta fibra foi escolhida com base no estudo realizado por Nunes *et al.* [13]. Estes autores quantificaram o grau de metilesterificação em extratos de água e imidazol de ameixas utilizando dois tipos de fibra diferentes DVB/Carboxeno/PDMS e PDMS e verificaram que os melhores resultados na extração eram obtidos utilizando a DVB/Carboxeno/PDMS. A fibra utilizada neste trabalho possui um revestimento misto sendo utilizada na quantificação de muitos analitos (voláteis, semi-voláteis e compostos polares C₃-20 M_w 40-275 Da). Tendo uma maior sensibilidade para compostos pequenos e ácidos orgânicos devido ao aumento da capacidade de retenção resultante do efeito potenciador de adsorção para a fase estacionária. Os pequenos poros de carboxeno (10 Å, média) tornam o revestimento da fibra particularmente efetivo para a extração de pequenas moléculas. A espessura do seu revestimento é de 50/30 µm.

A fibra de SPME contendo os compostos voláteis presentes no espaço de cabeça do *vial* foi introduzida no injetor do GC-qMS (Agilent 6890N network GC system, com fabrico nos EUA). A coluna usada foi DB-FFAP (J&W Scientific, com fabrico EUA) tendo as seguintes características: 60 m de comprimento, 0,32 mm diâmetro e 0,25 µm de espessura. O programa de temperaturas do forno usado foi: a temperatura inicial do forno de 50 ° C subiu a uma taxa de 5 ° C min⁻¹ até aos 65 ° C. Seguidamente, a temperatura subiu a uma taxa de 20 ° C min⁻¹ até aos 185 ° C. Por fim, a temperatura subiu a uma taxa de 35 ° C min⁻¹ até aos 220 ° C, mantendo-se esta temperatura durante 1 min. A temperatura do injetor e do detetor era de 250 ° C.

Para determinar o teor de metanol foi construída uma curva de calibração. Esta foi elaborada expondo a fibra a uma solução padrão de metanol de concentração conhecida. As concentrações de metanol utilizadas encontravam-se entre 9 e 98 mg L⁻¹, as concentrações escolhidas estão de acordo com a quantidade esperada de metanol nos polissacarídeos pécnicos.

4.2.7. Análise por espectrofotoscopia de infravermelho médio (FT-IR-ATR)

Os espectros das amostras foram obtidos utilizando um espectrofotômetro de infravermelho (FT-IR-ATR, Perkin Elmer Spectrum BX), com uma resolução de 8 cm^{-1} e 32 varrimentos, na região de infravermelho médio ($4000,0\text{-}500,0\text{ cm}^{-1}$). Esta análise foi realizada numa sala com as condições de temperatura e humidade controladas ($T \approx 23\text{ }^{\circ}\text{C}$; humidade 35 %).

a) Análise dos resíduos insolúveis em álcool (AIRs)

A análise por FT-IR foi efetuada diretamente nos AIRs, não existindo uma preparação prévia da amostra. Antes da medição de cada amostra era realizado um *background spectra*, este é obtido sem a amostra colocada no percurso do feixe, refletindo as condições instrumentais e ambientais.

b) Análise ao preparado de fruta e ao iogurte com o preparado de fruta incorporado

Como para realizar a análise por FT-IR é necessário que a amostra tenha baixo teor em água, procedeu-se, assim, à sua secagem. Esta análise foi realizada para apenas uma amostra de preparado de fruta. Assim, a amostra utilizada foi a correspondente à amostra 060_1 mm. No que diz respeito à amostra de iogurte foi utilizado a base láctea com o preparado 060_1 mm incorporado, tendo sido utilizada uma dosificação de 30%. A primeira etapa consistiu em diluir duas gotas de iogurte e de preparado de fruta em 50 mL de água destilada. Os recipientes com as amostras diluídas ficaram durante 65 horas em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que as partículas em suspensão precipitassem por ação da força gravítica. Após este tempo, o sobrenadante foi separado do precipitado por decantação. Os precipitados obtidos foram colocados numa caixa de *petri* e como ainda continham uma elevada percentagem de água foram secados numa estufa a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, aproximadamente. Depois de secos, os precipitados foram analisados por FT-IR. Foram efetuadas duas medições para cada amostra. Antes da medição de cada amostra foi realizado um *background spectra*, este era obtido sem amostra colocada no percurso do feixe, refletindo as condições instrumentais e ambientais.

4.3. Avaliação das características visuais e estabilidade das polpas e preparados de fruta

As características visuais das polpas foram avaliadas nos dias da preparação, 1 e 2 dias após a preparação e na polpa congelada. Para tal, as amostras de polpa foram guardadas em copos com uma capacidade máxima para 100 g, com uma altura de 8 cm e diâmetro de 5 cm. Os copos foram preenchidos com polpa até à marca de 100 mL. Os parâmetros considerados foram a presença de

marcantes (pedaços de fruta que permaneceram na polpa), sementes inteiras ou laminadas nas polpas de morango e a ocorrência de separação de fases em todas as polpas (polpa na parte superior do copo e água na parte inferior do copo).

De forma a avaliar o comportamento dos preparados ao longo dos 60 dias da sua validade, usaram-se embalagens com uma capacidade máxima para 500 g, com uma altura de 12 cm e um diâmetro de 10 cm. Cada embalagem foi preenchida com preparado até aos 8 cm de altura. Assim, o comportamento foi avaliado nos dias 1, 7, 20, 40 e 60 para se verificar a ocorrência de sinerese, se este se mantinha com um aspeto uniforme ou se ocorria separação de fases. Durante o tempo de armazenamento a 4 ° C, o preparado esteve na câmara de refrigeração em condições estáticas, com ausência de *stress* mecânico.

4.4. Avaliação da estabilidade do iogurte após a incorporação do preparado

Os preparados desenvolvidos no âmbito deste projeto tinham como destino final a indústria iogurteira. Assim, era necessário avaliar o comportamento do iogurte quando estes preparados eram adicionados nestas bases lácteas. Todos os preparados, polpa pasteurizada e preparado sem PME foram aplicados em dois tipos de iogurte: iogurte batido e grego. O iogurte batido foi obtido a partir de iogurtes sólidos. Para a sua preparação estes foram batidos recorrendo a uma colher de sopa. Posteriormente, foram açúcarados a 8%. Por sua vez, o iogurte grego foi açúcarado a 8%. Todos os preparados foram incorporados nestas bases segundo os rácios de 9,4, 20 e 30%. O comportamento do iogurte foi avaliado no momento da aplicação, no dia a seguir a aplicação, no dia 7 e 22. As duas destabilizações observadas foram a presença de uma camada de água a superfície (sinerese) e o talhamento do iogurte.

Seguidamente, seguem-se os ensaios realizados para saber o que estaria na origem do talhamento do iogurte:

Ensaio 1: Aplicação da enzima PME em iogurte

Este ensaio consistiu na incorporação de 30% de água em iogurte (solução controlo) e uma solução com x% de água e y% de PME também incorporada a 30%. Ainda se realizou mais uma incorporação que consistia em aplicar só a PME em iogurte, utilizando y% de PME.

Ensaio 2: Preparado de morango 060_3 mm com um binómio de pasteurização de 95 ° C durante 5 min (descrito no tópico 4.1.3.), seguida da sua aplicação em iogurte a 30%.

Ensaio 3: Preparação dos controlos: polpa pasteurizada e preparado sem PME (descrito no tópico 4.1.3)

Ensaio 4: Análise por FT-IR ao precipitado de iogurte e preparado de fruta (descrito no tópico 4.2.7.)

Ensaio 5: Desestabilização do iogurte associada aos ácidos orgânicos.

Foram realizadas duas soluções de água com 0,06% de ácido ascórbico e ácido cítrico. O pH das soluções e do iogurte foi medido. Posteriormente, estas soluções foram aplicadas a 30% e medido o pH do iogurte + solução.

Ensaio 6: Desestabilização do iogurte associada aos polissacarídeos pécticos. Avaliação do comportamento do iogurte após a incorporação de várias soluções de composição conhecida (Tabela 7) em iogurte batido com uma dosificação de 30%.

Em todas as soluções realizadas começou-se por dispersar a pectina comercial em água quente ($\approx 60^\circ \text{C}$) recorrendo ao uso de uma varinha elétrica durante 3 min. Seguidamente, foram adicionados os restantes componentes da solução. A solução foi pasteurizada a 85°C durante 10 min numa placa de indução.

Tabela 7 – Soluções de pectina para aplicação em iogurte a 30%.

Ingredientes	Soluções % (m/m)				
	1	2	3	4	5
Água fria	85,58	84,72	85,58	85,58	85,58
Pectina LM ²	0,28 ¹	0,28 ¹	-	-	-
Pectina LM amidada ²	-	-	0,28 ¹	-	0,14
Pectina HM ²	-	-	-	0,28 ¹	0,14
Açúcar	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
Sorbato de Potássio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Cloreto de Cálcio	-	0,85	-	-	-
Ácido Ascórbico	-	-	-	-	-
Ácido Cítrico	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04

¹ Percentagem de pectina concordante com a presente nas amostras em estudo

² Pectina LM e LM amidada fornecida por Cargill® e a pectina HM foi fornecida pela CP Kelco®. Segundo fichas técnicas que acompanham o produto, a pectina LM tem um grau de metilesterificação entre 33-37%, a pectina LM amidada tem um grau de metilesterificação de 26-29% e um grau de amidação de 19-22% e, por fim, a pectina HM tem tipicamente um grau de metilesterificação de 70%.

4.5. Análise Estatística

Os ensaios de caracterização físico-química das polpas frescas e congeladas e preparados de fruta *FruitOnly* foram delineados de forma a que todos os dias de amostragem tivessem três réplicas para cada parâmetro em estudo. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) foi efetuada para todos os dados tendo como fatores o tempo e a granulometria. Recorreu-se ao teste de *Tukey* para a separação de médias a $\alpha=0,05$. Todas as análises utilizaram o software IBM SPSS Statistics 20,0 para o Windows (SPSS, Chicago, EUA).

5. Resultados e discussão

No âmbito do projeto *FruitOnly* transformou-se vários lotes de fruta congelada em polpa, recorrendo a um equipamento industrial que cortou a fruta com uma granulometria de 1 mm e a um equipamento laboratorial que cortou a fruta com uma granulometria de 0,5 e 3 mm, sendo que estes dois equipamentos têm modos de funcionamento muito semelhantes. Com o intuito de não adicionar compostos que conferem textura ao produto final (aditivos) utilizou-se um auxiliar tecnológico, a Pectina Metil Esterase (PME). Assim, as polpas de fruta foram tratadas com esta enzima. Este auxiliar tecnológico irá promover a desesterificação dos polissacarídeos pécticos [8], tornando estes polímeros capazes de formarem gel na presença do cálcio, naturalmente presente na fruta [28]. As 15 polpas de fruta e os 16 preparados de fruta foram caracterizados físico-quimicamente.

5.1. Caracterização físico-química das polpas e preparados de fruta

5.1.1. Teor de sólidos solúveis

Um dos parâmetros considerados quando se avalia a qualidade de um preparado de fruta é o teor de sólidos solúveis. Este também é um parâmetro importante quando a fruta utilizada para a realização dos preparados é comprada aos fornecedores, sendo este parâmetro especificado na ficha técnica do produto (Tabela 4 apresentada no tópico Materiais e Métodos). Na Tabela 8 estão representados os valores obtidos para o TSS para a polpa de fruta e respetivo preparado estudados. Estes valores foram medidos para a polpa congelada e no dia 1 do preparado. Foram escolhidos estes tempos uma vez que no desenvolvimento de todos os preparados se utilizaram polpas de fruta previamente congeladas. No caso dos preparados está representado o primeiro dia uma vez que é prática comum registar os valores 24 horas após a produção do preparado. Este registo serve para controlar se o preparado obtido está dentro dos parâmetros previamente estipulados para obter um produto com as características desejadas, e quando se encontrar dentro dos parâmetros é considerado apto para posterior utilização, sendo que depois estas informações são fornecidas ao cliente. Nesta tabela ainda está representado o TSS da polpa fresca efetuando-se uma média dos valores obtidos nos três dias de amostragem (Dia 0, 1 e 2) e apresentando o respetivo desvio padrão. Nos preparados foi realizado exatamente o mesmo, obtendo-se uma média dos valores nos dias 7, 20, 40 e 60 e apresentando o respetivo desvio padrão. Procedeu-se a este tratamento dos resultados por não existirem grandes diferenças no que diz respeito ao TSS ao longo do tempo.

Pela análise da Tabela 8 observa-se que o TSS para as várias polpas se encontra compreendido entre 4,7 e 10,9 ° Bx. No caso dos preparados, os valores estão entre 20,0 e 26,7 ° Bx. Assim, o TSS na polpa de fruta é mais baixo do que no preparado cerca de 14 ° Bx para as várias polpas e respectivos preparados. Esta variação deve-se à adição de 14% (m/m) de açúcar branco na formulação do preparado. O TSS da maioria das polpas encontra-se no intervalo indicado nas fichas técnicas dos fornecedores (ver Tabela 4). As amostras que não estão dentro deste intervalo são de morango 109, alperce 25 e pêsego, cortadas no equipamento industrial com uma granulometria de 1 mm, apresentando um valor ligeiramente mais baixo, com uma diferença de, aproximadamente, 0,5; 0,5 e 1,2 ° Bx, respetivamente. Uma possível explicação para esta variação poderá estar relacionada com os equipamentos de corte uma vez que a máquina industrial apresenta desperdícios superiores em relação à máquina laboratorial. Verifica-se que o TSS da framboesa é de 10,9 ° Bx, sendo o fruto com o valor mais elevado em comparação com os restantes.

No que diz respeito aos preparados pretendia-se que o TSS fosse de 23 ± 2 ° Bx, este valor foi atingido com a adição de açúcar branco. Observa-se que todos os preparados de morango e alperce se encontram dentro deste requisito. No caso dos preparados de framboesa, o TSS é ligeiramente superior a 25 ° Bx e no preparado P_1 mm, o valor do TSS encontra-se abaixo de 21 ° Bx. Nestes casos, uma pequena redução ou aumento da quantidade de açúcar permite que o TSS fique dentro do intervalo estipulado, porém a percentagem a reduzir ou a aumentar é tão diminuta que nestes casos não se justifica existir alteração. Por sua vez, o preparado P_3 mm encontra-se dentro do intervalo especificado para o TSS.

Tabela 8 – Teor de sólidos solúveis (° Bx) para cada polpa e preparado de morango (M), framboesa (F); alperce (A) e pêssgo (P).

Amostra	Teor de sólidos solúveis (° Bx)			
	Polpa Fresca (Dia 0, 1 e 2)	Polpa Congelada	Preparado (Dia 1)	Preparado (Dia 7, 20, 40 e 60)
M060_1 mm (I)	7,4±0,2	7,5±0,3	21,6±0,4	21,4±0,2
M060_0,5 mm (L)	7,5±0,0	7,6±0,2	22,0±0,1	22,1±0,2
M060_3 mm (L)	7,7±0,1	7,7±0,1	21,9±0,1	22,0±0,1
M108_3 mm (L)	7,7±0,1	7,5 ±0,0	22,9±0,1	22,8±0,1
M109_1 mm (I)	5,5±0,3	5,6±0,3	20,7±0,5	20,9±0,6
M109_3 mm(L)	6,4±0,1	6,4±0,2	21,6±0,1	21,4±0,1
M113_1 mm (I)	7,6±0,2	7,4±0,0	21,8±0,2	21,6±0,1
M113_3 mm (L)	7,7±0,1	7,7±0,2	22,4±1,0	22,9±0,2
F_1 mm (I)	10,9±0,2	10,9±0,1	25,6±0,1 (30 min) 26,2±0,2(60 min)	25,5±0,2 (30 min) 26,7±0,6 (60 min)
A25_1 mm (I)	6,5±0,1	6,5±0,1	21,0±0,1	21,5±0,4
A25_3 mm (L)	7,6±0,1	7,7±0,1	22,7±0,2	22,9±0,1
A27_1 mm (I)	7,7±0,2	7,6±0,2	22,7±0,1	22,7±0,1
A27_3 mm (L)	7,9±0,2	7,8±0,1	22,7±0,1	22,7±0,1
P_1 mm (I)	4,8±0,2	4,7±0,1	20,1±0,1	20,0±0,3
P_3 mm (L)	6,9±0,1	6,9±0,3	23,2±0,1	23,1±0,1

Média ± desvio padrão ($n=3$ por cada dia de amostragem); I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

5.1.2. pH

Na Tabela 9 estão representados os valores de pH, o estudo destes valores foi realizado de forma idêntica ao apresentado anteriormente para os TSS. Pela análise desta tabela verifica-se um aumento do pH da polpa para o preparado correspondente à mesma amostra, este aumento encontra-se entre 0,01 e 0,30, sendo que o aumento mínimo ocorre na amostra A27_ 3 mm e o aumento máximo na amostra P_1 mm. Os preparados desenvolvidos têm na sua constituição 85% de polpa, podendo-se referir que a polpa que está no preparado se encontra diluída em relação à amostra de polpa inicial, esta diluição leva a uma diminuição da concentração de H^+ . As polpas e preparados que apresentam um pH mais baixo são os de framboesa, valores de pH compreendidos entre 3,08 e 3,15 e A27_1 mm entre 3,26 e 3,33. Por sua vez, o pH mais alto verifica-se nas amostras de P_1 mm, valores registados entre 3,74 e 4,05 e P_3 mm, entre 3,78 e 3,91. Conclui-se que todos os valores de pH obtidos nas diferentes amostras se encontram de acordo com os valores estabelecidos nas fichas técnicas do produto (Tabela 4).

Tabela 9 – Valores de pH determinados para as polpas e preparado de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssgo (P).

Amostra	pH			
	Polpa fresca (Dia 0, 1 e 2)	Polpa congelada	Preparado (Dia 1)	Preparado (Dia 7, 20, 40 e 60)
M060_1 mm (I)	3,61±0,10	3,59±0,07	3,67±0,01	3,63±0,01
M060_0,5 mm (L)	3,53±0,04	3,51±0,01	3,63±0,01	3,60±0,03
M060_3 mm (L)	3,56±0,04	3,54±0,01	3,66 ±0,01	3,64±0,02
M108_3 mm (L)	3,50±0,05	3,55±0,01	3,63 ±0,01	3,57±0,06
M109_1 mm(I)	3,55±0,09	3,49±0,05	3,63±0,01	3,64±0,07
M109_3 mm (L)	3,50±0,04	3,56±0,01	3,69±0,01	3,66±0,06
M113_1 mm (I)	3,45±0,09	3,40±0,01	3,47±0,02	3,53±0,05
M113_3 mm (L)	3,40±0,40	3,45±0,01	3,47±0,02	3,50±0,06
F_1 mm (I)	3,17±0,15	3,08±0,00	3,11±0,03 (30 min)	3,14 ±0,03 (30 min)
			3,15±0,00 (60 min)	3,14 ±0,04 (60 min)
A25_1 mm (I)	3,49±0,11	3,38±0,02	3,52±0,03	3,44±0,02
A25_3 mm (L)	3,28±0,05	3,29±0,01	3,27±0,02	3,27±0,01
A27_1 mm(I)	3,33±0,11	3,26±0,02	3,33±0,01	3,33±0,01
A27_3 mm (L)	3,41±0,04	3,43±0,02	3,44±0,01	3,41±0,04
P_1 mm (I)	3,87±0,08	3,74±0,07	4,04±0,00	4,04±0,06
P_3 mm (L)	3,78±0,06	3,80±0,01	3,91±0,01	3,91±0,07

Média ± desvio padrão ($n=3$ por cada dia de amostragem); I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada a nível em polpa laboratorial.

5.1.3. Fluidez e viscosidade

Na indústria iogurteira para incorporar os preparados em iogurte utilizam-se bombas. Desta forma, os preparados muito viscosos não conseguem ser bombeados para os tanques onde se encontra o iogurte. Por sua vez, os preparados com pouca viscosidade, ou seja, muito líquidos vão produzir um iogurte muito líquido, perdendo, assim, as propriedades desejadas. Assim, pretendia-se que a fluidez final, medida no consistómetro de *Bostwick*, apresentasse um valor de 8 ± 2 cm.

5.1.3.1. Relação entre o tratamento da polpa com a enzima PME e a diminuição da fluidez (aumento da viscosidade)

A Tabela 10 é referente às polpas e preparados de morango. Nesta tabela estão representados os valores de fluidez em cm/60 s para a polpa fresca (dia 0, 1 e 2), para a polpa congelada e para os preparados (Dia 1). Pela análise da mesma observa-se que as amostras M060 cortadas a 0,5; 1 e 3 mm e M108 cortada a 3 mm não apresentam diferenças significativas na sua fluidez ($p>0,05$) ao longo dos vários dias de amostragem da polpa fresca. Verifica-se para a polpa M109_1 mm e

M113_1 mm que existiu uma diminuição fluidez do dia 0 para o dia 1 e voltando a aumentar do dia 1 para o dia 2. Esta ocorrência pode ser o resultado de uma homogeneização deficiente da polpa aquando da sua preparação, conduzindo a que representações da mesma amostra tenham menos fluidez do que outras por existir um maior conteúdo de sólidos em suspensão. No caso da amostra M109_3 mm ocorre um aumento da fluidez do dia 0 para o dia 1, mantendo-se constante nos restantes dias. As diferenças mais notórias na fluidez foram registadas na amostra M113_3 mm dado que se observa uma diminuição acentuada da fluidez ao longo dos três dias de amostragem. No segundo dia após a sua preparação quase não existia espalhamento da polpa no *Bostwick*, percorrendo apenas $2 \pm 0,50$ cm/60 s. Esta polpa formava um gel forte, como consequência adquiria uma aparência de um pudim. Assim, sugere-se que os polissacarídeos pécnicos presentes nesta polpa se encontram naturalmente desesterificados, permitindo a interação deste polímero com os iões de cálcio presentes na polpa, existindo a formação de gel [28].

Todos os preparados de fruta foram produzidos a partir de polpa congelada. Assim, a efetividade do tratamento enzimático nas polpas foi avaliado pela comparação dos resultados de fluidez obtidos na polpa congelada e preparado dia 1. A polpa de M060_0,5 mm após o tratamento enzimático apresenta a maior diminuição da fluidez, com uma redução de 15 cm. Nas polpas M060_1 mm e M109_3 mm, o tratamento com a enzima não teve influência na fluidez. No entanto, as polpas beneficiaram com o tratamento enzimático uma vez que a sua textura melhorou. Nestas polpas a influência da enzima não foi tão pronunciada dado que as polpas já tinham uma concentração otimizada do seu teor de sólidos. Na amostra M113_3 mm também o tratamento com a enzima PME não teve grande influência na sua fluidez visto que os polissacarídeos pécnicos já se encontravam desesterificados antes da atuação da enzima.

Tabela 10 – Fluidez em cm/60 s no dia 0, 1 e 2 para a polpa, condição de polpa congelada, e no dia 1 para preparados de morango (M).

Amostra	Fluidez (cm/ 60 s)							
	M060_1mm	M060_0,5mm	M060_3mm	M108_3mm	M109_1mm	M109_3mm	M113_1mm	M113_3mm
	(I)	(L)	(L)	(L)	(I)	(L)	(I)	(L)
Polpa								
fresca (Dia 0)	14,17±0,95 ^{aC}	24,00±0,00 ^{aA}	13,67±0,14 ^{aB}	10,58±0,14 ^a	23,75±0,43 ^{aA}	11,50±0,50 ^{aA}	13,00±0,25 ^{abA}	11,58±0,14 ^{aB}
Polpa								
fresca (Dia 1)	10,25±0,25 ^{aC}	24,00±0,00 ^{aA}	18,08±3,15 ^{aB}	11,33±0,38 ^a	14,33±6,23 ^{aA}	13,00±0,43 ^{baA}	11,83±0,14 ^{abA}	9,00±0,43 ^{bbB}
Polpa								
fresca (Dia 2)	12,25±2,38 ^{aC}	24,00±0,00 ^{aA}	16,83±3,18 ^{aB}	11,33±0,14 ^a	24,00±0,00 ^{aA}	13,33±0,38 ^{baA}	12,83±0,76 ^{baA}	2,00±0,50 ^{dbB}
Polpa								
congelada	14,33±2,52 ^{aC}	24,00±0,00 ^{aA}	17,00±0,66 ^{aB}	12,42±0,14 ^b	24,00±0,43 ^{aA}	13,67±0,50 ^{baA}	13,33±0,25 ^{aA}	5,83±0,14 ^{cB}
Preparado (Dia 1)	14,00±0,50 ^A	9,00±0,87 ^B	10,83±1,04 ^B	6,17±0,14	12,17±0,52 ^A	12,67±0,29 ^A	6,50±0,75 ^A	1,33±0,14 ^B

Média ± desvio padrão ($n=3$ por dia de amostragem); I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p<0,05$), quando o fator tempo está fixado.

^{ABC} letras diferente correspondem a amostras significativamente diferentes ($p<0,05$), quando o fator granulometria está fixado.

Na Tabela 11 encontram-se representados os valores de fluidez em cm/60 s para a polpa fresca (dia 0,1 e 2), polpa congelada e preparado (dia 1) para as amostras de framboesa, alperce e pêssgo. Na polpa de framboesa existe um aumento da fluidez em 9,91 cm do dia da preparação (dia 0) relativamente à fluidez da polpa congelada. Sugere-se que este aumento esteja associado a um maior impacto da congelação, uma vez que esta amostra apresentou uma maior degradação depois do descongelamento em comparação com as polpas dos outros frutos em estudo. Devendo-se esta ocorrência à formação dos cristais de gelo durante a congelação e também ao facto destas polpas não se encontrarem pasteurizadas, apresentando atividade enzimática o que produz um aspeto degradado, dado que as enzimas estão ativas durante o processo de descongelação [107, 108]. Comparando as duas condições com PME, 30 e 60 min, para a polpa de framboesa, verifica-se que a nível de fluidez existiu uma diminuição de 1,33 cm do preparado F_30 min para o F_60 min. Assim, pode-se sugerir que o tratamento enzimático mais longo não tem grande influência na fluidez da amostra. Porém, a observação visual dos preparados permitiu classificar o preparado F_60 min como aquele que possui uma textura mais adequada e um aspeto cremoso. Apesar do preparado F_60 min ser mais atrativo do que o F_30 min, encontra-se fora do valor especificado

para o consistômetro de *Bostwick*, logo não é possível comercializá-lo. Uma possível solução seria proceder à concentração da polpa antes do tratamento com a PME, visto que ao aumentar o teor de sólidos presentes existe uma diminuição da fluidez. Por sua vez, propor um tratamento mais longo com a enzima não é solução uma vez que industrialmente é impraticável.

No caso dos preparados de alperce 25 cortados a 1 e a 3 mm, durante o tempo de amostragem da polpa fresca não existem alterações significativas ($p>0,05$) na fluidez. O tratamento enzimático permite uma diminuição da fluidez de 18,58 cm na amostra de A25_1 mm. No caso, da amostra de A25_3 mm é de 10,5 cm. Sugere-se que na amostra de polpa A25_1 mm, o tratamento com enzima produz uma maior alteração a nível da fluidez, uma possível explicação passa pelos polissacarídeos pécicos estarem mais disponíveis para interagir com o cálcio. No que diz respeito aos preparados de alperce 27, não existem diferenças significativas ($p>0,05$) na fluidez ao longo do tempo de amostragem. Verifica-se no preparado de A27_1 mm, um aumento da fluidez da polpa fresca para a polpa congelada de 5,41 cm. Por sua vez, após o tratamento com a enzima PME existe uma diminuição da fluidez de 2,25 cm. No caso do preparado de A27_3 mm a diminuição da fluidez foi de 1,25 cm. No caso dos preparados de alperce 27, o tratamento com a enzima não teve uma grande influência, podendo o teor de sólidos solúveis estar otimizado. Porém, foi possível verificar em comparação com a polpa congelada que existe uma estabilização da fase dispersa e que a amostra adquire textura. Os dois lotes de alperce utilizados possuem comportamentos diferentes após o tratamento com a enzima, observando-se uma maior diminuição da fluidez nas amostras do lote de alperce 25 relativamente ao lote de alperce 27.

No caso do pêsego, durante o tempo de amostragem da polpa fresca não existem diferenças significativas ($p>0,05$) na fluidez. Na polpa de P_1 mm existe um aumento da fluidez da polpa fresca para a polpa congelada de 13,91 cm. Por sua vez, este aumento não é significativo ($p>0,05$). O tratamento da amostra P_1 mm com a PME produziu uma diminuição da fluidez de 1,25 cm, sendo esta diminuição pouco considerável. O preparado final apresenta-se muito líquido e com pouca consistência. No caso da amostra P_3 mm, o tratamento com a PME melhorou a consistência da polpa, originando uma diminuição cerca de 4,91 cm.

Tabela 11 – Fluidez em cm/60 s no dia 0, 1 e 2 para a polpa, condição de polpa congelada, e no dia 1 para os preparados de framboesa (F), alperce (A) e pêssego (P).

Amostra	Fluidez (cm/ 60 s)							
	F_30 min	F_60 min	A25_1 mm	A25_3 mm	A27_1 mm	A27_3 mm	P_1 mm	P_3 mm
			(I)	(L)	(I)	(L)	(I)	(L)
Polpa fresca (Dia 0)	9,92±0,63 ^c		15,17±2,18 ^{bA}	9,83±0,38 ^{aB}	11,42±1,28 ^{bA}	10,75±0,25 ^{aA}	7,17±0,76 ^{bA}	8,58±2,10 ^{aA}
Polpa fresca (Dia 1)	12,08±0,95 ^{bc}		17,42±1,42 ^{abA}	11,08±0,38 ^{aB}	9,00±1,00 ^{bA}	9,75±1,09 ^{aA}	6,25±0,35 ^{bB}	10,92±0,88 ^{aA}
Polpa fresca (Dia 2)	12,92±1,88 ^b		21,00±1,80 ^{aA}	9,67±0,72 ^{aB}	9,17±1,63 ^{bA}	9,50±0,66 ^{aA}	5,75±0,71 ^{bA}	9,75±2,17 ^{aA}
Polpa congelada	19,83±0,58 ^a		20,50±1,32 ^{aA}	11,08±0,63 ^{aB}	16,83±2,30 ^{aA}	11,42±1,44 ^{aB}	21,08±0,52 ^{aA}	10,58±0,38 ^{aB}
Preparado (Dia 1)	16,83±0,29 ^A	15,50±0,66 ^A	1,92±0,38 ^A	0,58±0,14 ^B	14,58±0,52 ^A	10,17±0,29 ^B	19,83±0,29 ^A	5,67±0,58 ^B

Média±desvio padrão ($n=3$ por dia de amostragem); I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras significativamente diferentes ($p<0,05$), quando o fator tempo está fixado.

^{ABC} letras diferente correspondem a amostras significativamente diferentes ($p <0,05$), quando o fator granulometria está fixado.

De uma forma geral, o tratamento com a PME foi efetivo na alteração das características reológicas das polpas dado que existe uma diminuição da fluidez e a sua textura também se modificou. Dado que em todas as amostras de polpa foi possível observar que após o descongelamento existe uma separação entre a água presente na polpa e os componentes que dão textura à polpa, é possível concluir que o tratamento das polpas com enzima PME possibilita a melhoria da estabilidade da fase dispersa da preparação bem como promove a sua uniformidade, uma vez que não ocorreu separação de fases.

Foi possível observar que os preparados que apresentam um aspeto gelificado têm uma granulometria de 0,5 e 1 mm. Por sua vez, os preparados com uma granulometria de 3 mm não apresentam um aspeto tão gelificado, associando-se a sua aparência viscosa aos fragmentos do próprio fruto. Assim, sugere-se que nas polpas com granulometria de 0,5 e 1 mm, os polissacarídeos pécticos se encontrem mais dispersos na polpa e como não existem tantos fragmentos de fruta como existem na granulometria de 3 mm, a PME desesterifica estes polissacarídeos pécticos e estes reagem com o cálcio, formando um gel. No caso da polpa de 3 mm, os polissacarídeos pécticos estão mais concentrados nos fragmentos do fruto, atuando a PME, mais a esse nível. No entanto, também atua nos polissacarídeos pécticos que se encontram dispersos na polpa uma vez que permite que os fragmentos estejam espalhados uniformemente

pelo preparado. Pode-se concluir que a enzima atua de forma diferente consoante a existência de mais ou menos fragmentos na polpa.

5.1.3.2. Estudo da viscosidade ao longo do tempo nas polpas e preparados

A Figura 10 mostra os resultados obtidos para a fluidez e viscosidade nos preparados de morango desenvolvidos a partir das amostras de polpa do lote M060. A Figura 10 a) diz respeito aos valores de fluidez em cm/ 60 s e a Figura 10 b) diz respeito aos valores de viscosidade em Pa.s. Assim, a Figura 10 a) mostra a resistência do preparado ao escoamento medida no consistômetro de *Bostwick* enquanto que a Figura 10 b) mostra a resistência ao movimento de rotação de um eixo metálico medida num viscosímetro de *Brookfield*. Por norma, deve-se ter uma resposta linear dos preparados quando registados os seus valores no *Bostwick* e no *Brookfield*. Assim, quando um preparado é muito viscoso espera-se obter um valor no *Bostwick* baixo e um valor no *Brookfield* alto. No caso destas amostras existe uma tendência para uma diminuição da fluidez/ aumento da viscosidade ao longo do tempo. Na Figura 10 a) observa-se que não existe um comportamento regular da fluidez dos preparados ao longo do tempo, verificando-se que existe uma diminuição da fluidez até ao dia 20, seguindo-se um aumento até ao dia 40, voltando a diminuir até ao dia 60. A Figura 10 b) mostra que nos três preparados existe um aumento da viscosidade até ao dia 20. A partir deste momento os preparados apresentam comportamentos díspares. Assim, no preparado M060_0,5 mm, a viscosidade diminui no dia 40, voltando a aumentar no dia 60. Por sua vez, o preparado M060_1 mm tem um comportamento inverso face ao anterior. Por último, o preparado M060_3 mm apresenta a mesma viscosidade do dia 20 ao dia 60.

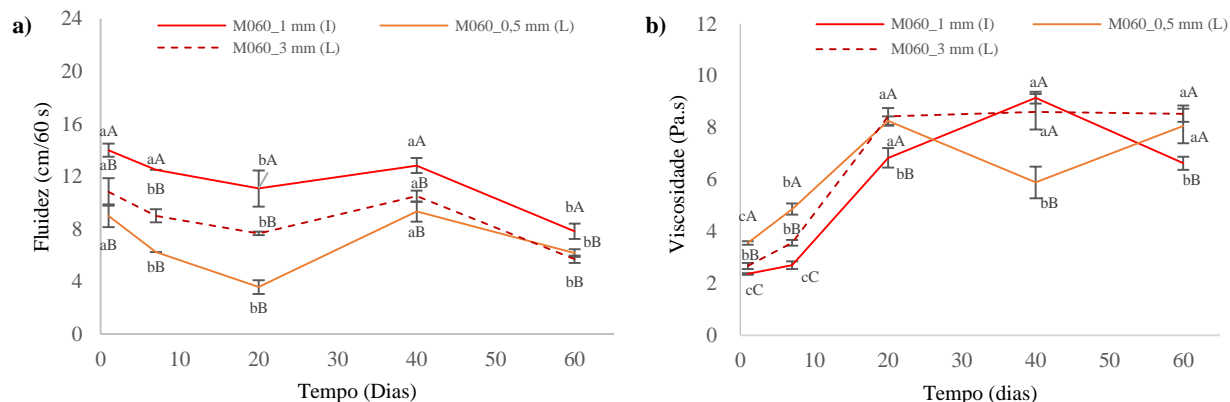


Figura 10 – Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote de morango 060 correspondente a morango inteiro congelado estático: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{ABC} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

Na Figura 11 estão representadas as variações da fluidez (cm/60 s) e viscosidade (Pa.s) para o M108_3 mm, M109_1 mm e M109_3 mm. Estas duas amostras são de morango IQF tendo a mesma origem geográfica e fornecedor. Tanto na Figura 11 a) como na Figura 11 b), a amostra que tem o comportamento mais irregular ao longo do tempo é a amostra 109_1 mm. Por sua vez, a amostra M108_3 mm e M109_3 mm têm um comportamento mais regular no período considerado.

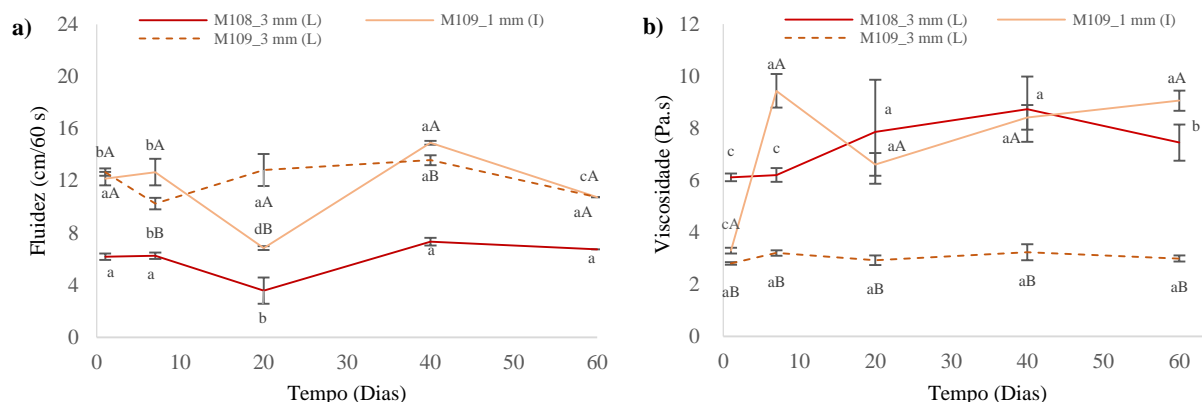


Figura 11 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote de 108 e 109 correspondente a morango IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

Na Figura 12 está representado o comportamento do preparado ao longo do tempo no que diz respeito à fluidez (cm/60 s) e viscosidade (Pa.s) para as amostras de morango M113. Na Figura 12 a) observa-se que na amostra M113_1 mm, existe diferenças de comportamento no dia 20 e 60, verificando-se uma diminuição da fluidez, e na amostra M113_3 mm a variação da fluidez ao longo do tempo é reduzida. No caso das medições realizadas no viscosímetro de *Brookfield* era de esperar que os valores da amostra M113_3 mm se mantivessem-se sempre mais elevados do que os da amostra M113_1 mm por ser a amostra que apresenta uma menor fluidez, no entanto, pela análise da Figura 10 b) tal não acontece uma vez que a partir do dia 20, a amostra M113_3 mm tem valores inferiores à M113_1 mm até ao final do período de tempo considerado.

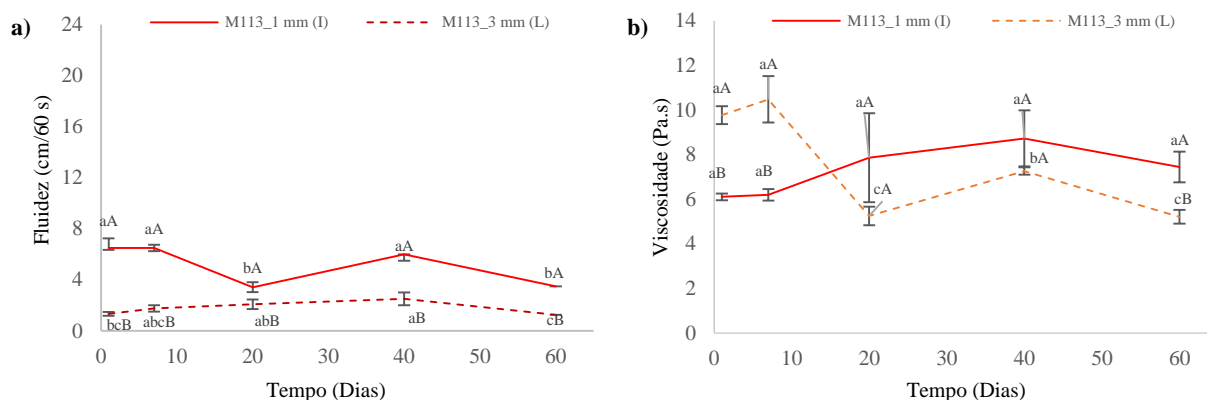


Figura 12 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote 113 correspondentes a morango IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: *abcd* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com *AB* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

A Figura 13 representa o estudo da fluidez (cm/60 s) e viscosidade (Pa.s) para as polpas e preparados de framboesa. Na Figura 13 a) é possível verificar que o preparado F_30 min manteve sempre a mesma fluidez ao longo do tempo, o que foi comprovado pela análise estatística realizada, verificando-se que nos cinco momentos de amostragem, os valores obtidos são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). No caso do preparado F_60 min percebe-se que a fluidez se mantém constante até ao dia 40, sendo estes momentos de amostragem estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Do dia 40 para o dia 60 existe uma diminuição da fluidez. Na Figura 13 b) observa-se para o preparado F_30 min, que nos dias 1 e 20 existe uma diminuição da viscosidade e que nos restantes dias a viscosidade se mantém. No caso do preparado F_60 min verifica-se que existe um aumento da viscosidade, ou seja, o preparado por ser mais consistente oferece mais resistência ao movimento do eixo metálico.

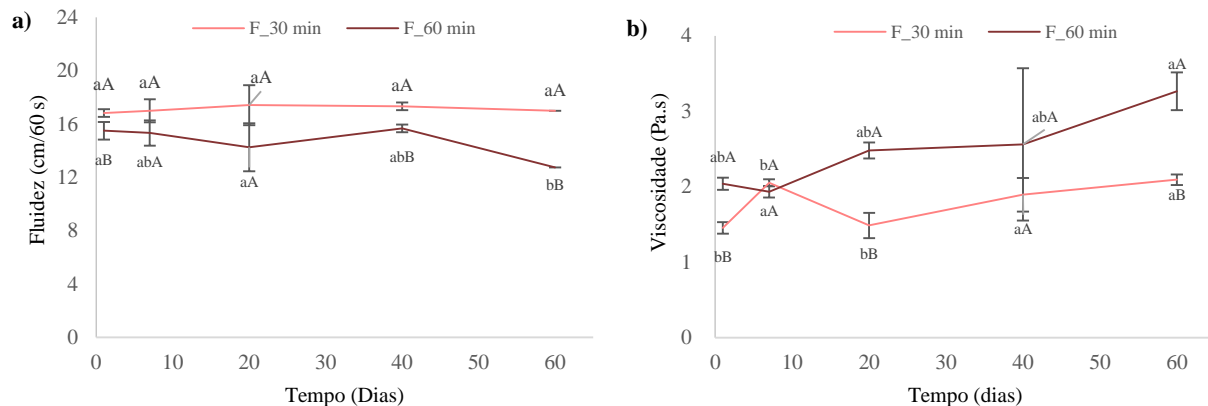


Figura 13 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote framboesa migalhas IQF a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: ^{abcd} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com ^{AB} letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

Na Figura 14 está representado o comportamento reológico dos preparados de alperce ao longo do tempo: a fluidez (cm/60 s) e viscosidade (Pa.s). Como se pode observar pelas duas figuras a) e b), representadas abaixo, os preparados de alperce mantêm uma viscosidade constante ao longo do tempo. Verifica-se uma relação linear entre as medições realizadas no consistómetro de *Bostwick* e no viscosímetro de *Brookfield*. Pode-se observar na Figura 14 que os preparados de alperce 25 apresentaram maior viscosidade do que os preparados de alperce 27, associando-se este fenómeno à ocorrência de uma desesterificação dos polissacarídeos pécnicos maior nos preparados de alperce 25, no entanto é necessário comprová-lo através de uma análise ao grau de metilesterificação.

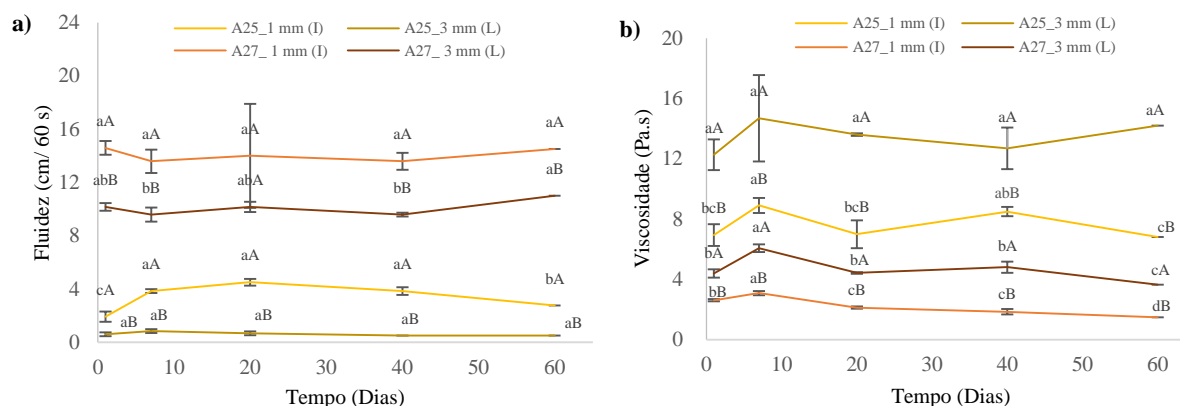


Figura 14 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote alperce IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: *abcd* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com *AB* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

O estudo da fluidez e viscosidade ao longo do tempo para os preparados de pêssago encontra-se representado na Figura 15, verificando-se a relação linear entre as medições realizadas no consistômetro de *Bostwick* e de *Brookfield*. Assim, o preparado mais fluído P_1 mm apresenta um valor maior no *Bostwick* e um valor menor no *Brookfield* do que o preparado menos fluído. O preparado P_1 mm não ganhou textura, sendo bastante fluído e apresenta ao longo do tempo uma fluidez de, aproximadamente, 20 cm/60 s. Por sua vez, o preparado de P_3 mm manteve um comportamento constante ao longo do tempo, apresentando uma fluidez de, aproximadamente, 5 cm/60 s.

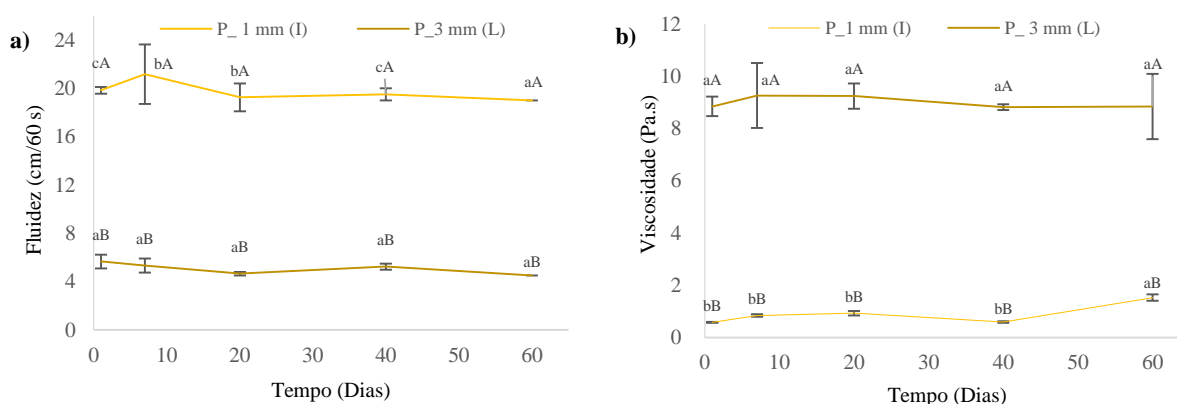


Figura 15 - Fluidez/viscosidade ao longo do tempo no lote pêssago por IQF: a) Fluidez em cm/60 s ao longo do tempo e b) Viscosidade em Pa.s ao longo do tempo. Nos gráficos encontra-se representada a análise estatística: *abcd* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator tempo é fixado e com *AB* letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando o fator granulometria está fixado. I fruta transformada em polpa a nível industrial; L fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

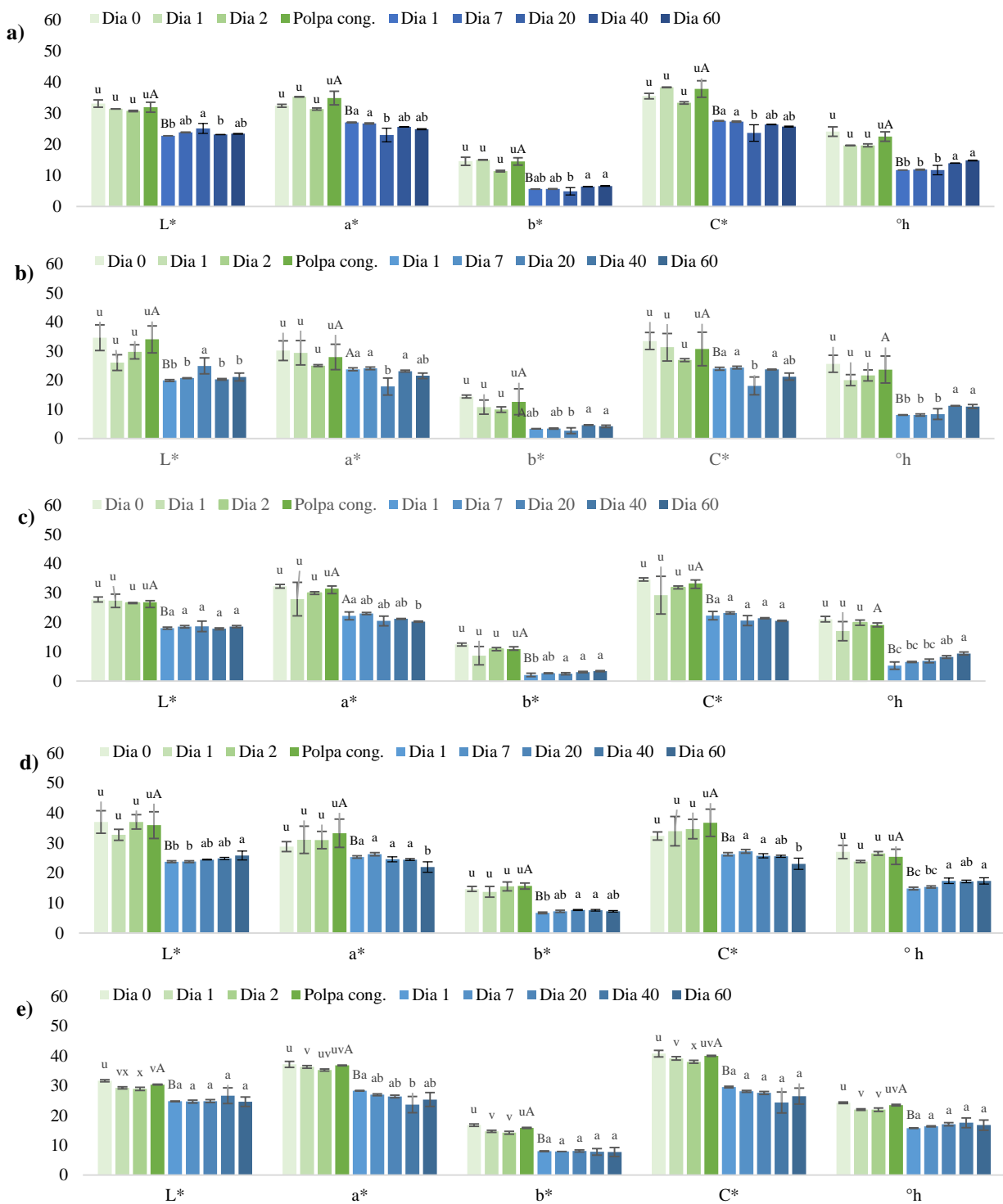
Estabelecendo uma comparação entre os vários preparados em estudo observa-se que os preparados de alperce e pêssego são mais estáveis ao longo do tempo no que diz respeito aos parâmetros fluidez e viscosidade do que os preparados de morango e framboesa.

5.1.4. Cor

De uma forma geral, as mudanças de cor nas amostras de morango, framboesa, alperce e pêssego mais drásticas ocorrem depois da polpa sofrer a pasteurização térmica. Durante o tempo em que a polpa esteve em refrigeração e durante o armazenamento do preparado as mudanças de cor foram mais ténues. No entanto, a temperatura de 85 ° C da pasteurização com um tempo de retenção de 10 min terá tido um efeito maior na degradação da cor. A degradação de cor dos alimentos quando são pasteurizados termicamente está associada destruição de pigmentos (antocianinas, carotenoides e clorofilas) e a reações de acastanhamento não enzimáticas (reações de *Maillard*) que ocorrem durante o aquecimento de frutas e vegetais [109].

As alterações na cor ocorridas em todas amostras de polpa e preparado de morango encontram-se representadas na Figura 16. Pela análise estatística verifica-se que em todos os parâmetros da cor, existem na maior parte dos casos, alterações estatisticamente significativas da polpa congelada para o preparado (dia 1) ($p < 0,05$). É importante referir que os elementos responsáveis pela cor do preparado estão naturalmente presentes na polpa utilizada, estes elementos são os pigmentos presentes no fruto, não sendo adicionados a estes preparados elementos exógenos como corantes. Assim, nos lotes de morango existe uma diminuição da L^* , tornando-se a amostra mais escura. Os parâmetros a^* e b^* também diminuem, existindo uma perda de vermelho e amarelo, o que também conduz ao escurecimento da amostra. Como consequência existe uma diminuição de C^* , uma vez que o valor de C^* é obtido pela seguinte fórmula $C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$. Assim, a cor torna-se menos viva com a diminuição de C^* , existindo uma perda de intensidade da cor. Também foi registada uma mudança na tonalidade ($^{\circ}h$), existindo uma perda de amarelo aproximando-se da cor vermelha. Assim, após o tratamento térmico existe uma alteração de vermelho mais vivo para vermelho mais escuro.

Para os preparados foi calculado o ΔE , verificando-se que o cliente se apercebe de alterações de cor ocorridas durante o armazenamento na amostra M109_1 mm no dia do término da sua validade (dia 60) e também é perceptível na amostra M113_3 mm a partir do dia 20.



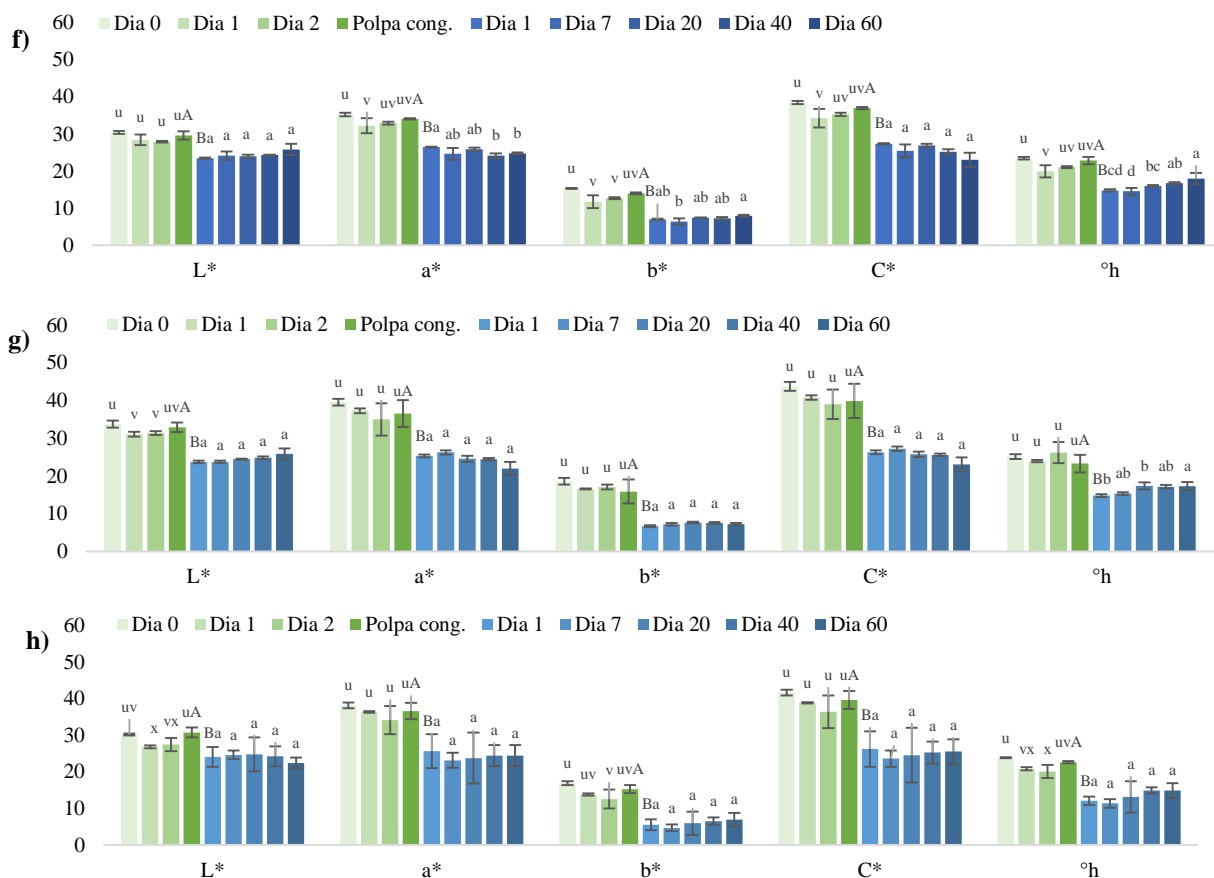


Figura 16 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c, d, e, f, g e h correspondem às amostras de morango estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra M060_1mm (I), b) à amostra M060_0,5 mm (L), c) à amostra M060_3 mm (L), d) à amostra M108_3 mm (L), e) à amostra M109_1 mm (I), f) à amostra M109_3 mm (L), g) à amostra M113_1 mm (I) e h) à amostra M113_3 mm (L).

A perda de cor nas amostras de framboesa (Figura 17) com a temperatura apresenta um comportamento semelhante ao do morango. Assim, existe um escurecimento da cor da framboesa. Este fruto apresenta naturalmente um vermelho mais escuro do que o morango. Também foi possível observar que não existem diferenças significativas na cor ($p>0,05$) dos dois preparados, ou seja, o facto do tratamento enzimático a 40 ° C durar 30 ou 60 min produz uma degradação da cor idêntica. Ao longo do armazenamento não existiram mudanças na cor perceptíveis pelo olho humano uma vez que o $\Delta E < 3$. Esta observação está de acordo com o trabalho realizado por Ochoa *et al.* [110] que observou numa amostra de polpa de framboesa pasteurizada que a cor era estável durante os 90 dias de armazenamento à temperatura de 4 ° C.

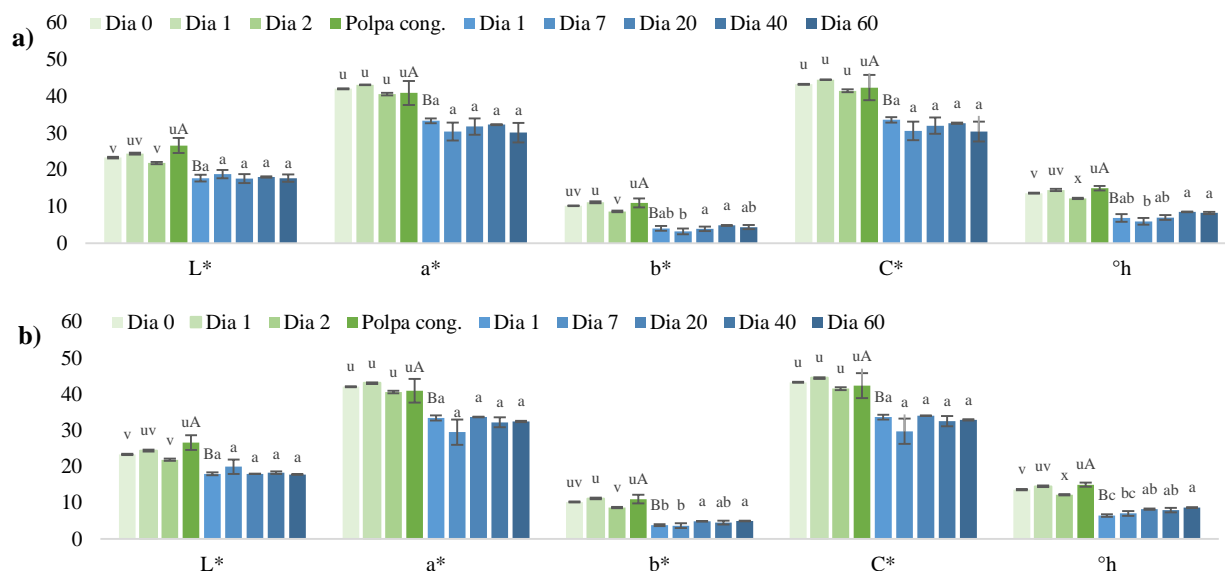


Figura 17 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a e b correspondem às condições estudadas para as amostras de framboesa. O gráfico a) corresponde à amostra F_30 min e b) à amostra F_60 min.

A cor das amostras de alperce (Figura 18) também foi afetada pela temperatura de processamento, existindo uma diminuição de L*, ocorrendo uma perda de amarelo que é verificada pela diminuição de b*. A diminuição de C* tem como efeito a cor se tornar mais pálida e, portanto menos intensa. Neste caso, não existe uma variação elevada da tonalidade. Após a produção do preparado existe uma alteração do amarelo do alperce para um amarelo mais escuro relativamente à polpa que lhe deu origem. Observa-se ainda que as amostras de alperce (25 e 27) cortadas a 3 mm apresentam uma cor mais saturada do que as cortadas a 1 mm. Esta diferença na cor é perceptível pelo olho humano. Durante o armazenamento a única amostra que apresentou mudanças na cor perceptíveis ao olho humano ($\Delta E > 3$) foi a amostra de alperce 25_3 mm, começando a notar-se esta mudança no dia 7.

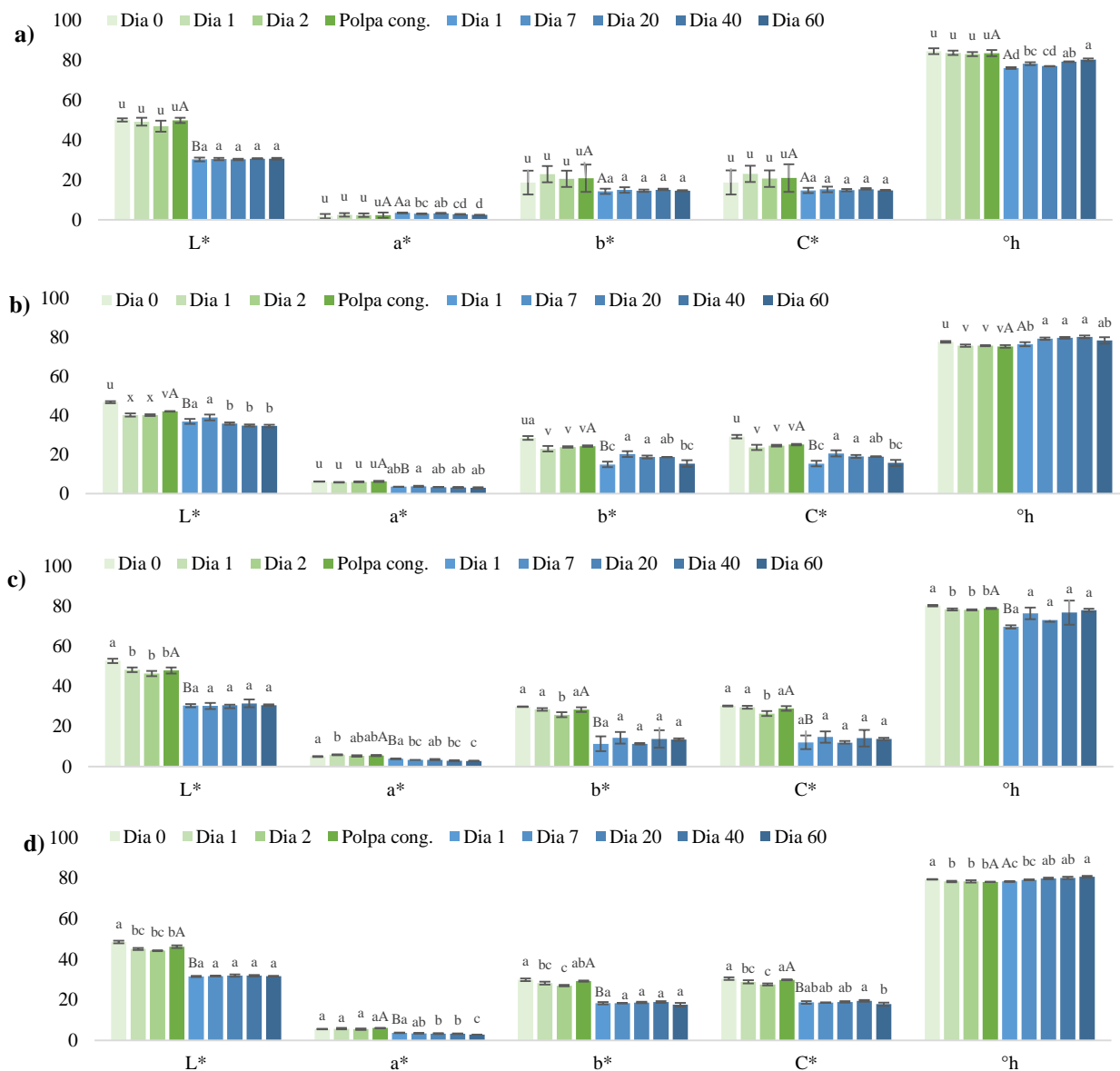


Figura 18 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c e d correspondem às amostras de alperce estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra de alperce 25_1 mm (I), b) à amostra de alperce 25_3 mm (L), c) à amostra de alperce 27_1 mm (I) e d) à amostra de alperce 27_3 mm (L).

A degradação de cor observada no pêssego (Figura 19) foi semelhante à do alperce. Logo a cor amarela do pêssego escureceu. Nas alterações de cor ocorridas durante o armazenamento estas são visíveis na amostra de pêssego_3 mm a partir do dia 40, uma vez que o $\Delta E > 3$.

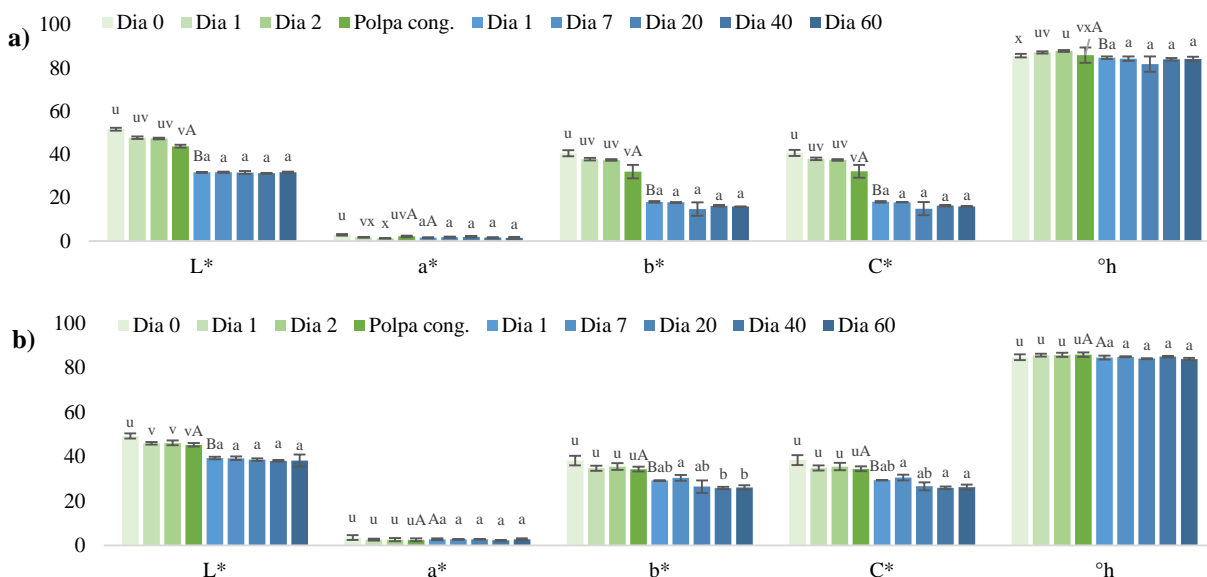


Figura 19 - Parâmetros de cor CIELab para polpas (barras a verde) e para preparados (barras a azul). Nos gráficos estão descritas as mudanças de cor da polpa para o preparado e as mudanças ao longo do tempo de amostragem de cada um. Os vários gráficos a, b, c e d correspondem às amostras de pêssgo estudadas. O gráfico a) corresponde à amostra de P_1 mm (I) e b) à amostra de P_3 mm (L).

Nas Figuras 16 a 19 encontra-se realizada a análise estatística para todas as amostras de polpa e preparado de morango, framboesa, alperce e pêssgo: ^{uvxz} mudanças na cor ocorridas na polpa; ^{abcd} mudanças ocorridas nos preparados e ^{AB} mudança de cor da polpa congelada para o preparado (dia 1). Letras diferentes correspondem a amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

5.2. Análise aos polissacarídeos pécticos presentes naturalmente nas amostras

5.2.1. Análise por espectrofotóscopia de infravermelho (FT-IR) dos resíduos insolúveis em álcool (AIR)

Nas Figuras 20 e 21 estão representados os espectros FT-IR relativos aos AIRs das amostras de morango inteiro estático, morango IQF, framboesa, alperce e pêssgo. Os espectros dos AIRs das diferentes polpas estão normalizados ente 0 e 1. Todos os espectros representados mostram elevada absorvância nos comprimentos de onda característicos dos polissacarídeos pécticos: 3440 cm^{-1} OH; 1750 cm^{-1} éster ($\text{C}=\text{O}$), 1630 cm^{-1} carboxilato e na sua região de *fingerprint* entre $1200\text{--}850\text{ cm}^{-1}$. Em todos os espectros o pico com absorvância mais elevada é 1014 cm^{-1} , sendo um dos comprimentos de onda característicos dos ácidos urónicos [111].

Na amostra de M113_3 mm foram detetados picos intensos a 2957 (grupo CH_3), 2852 (grupo CH_2) e 1742 (grupo $\text{C}=\text{O}$) cm^{-1} . A presença destes picos no espectro de FT-IR indicam a presença de gordura [112], considerou-se que esta provinha das sementes laminadas presentes na amostra.

De forma a provar esta suposição voltou-se a analisar esta amostra por FT-IR. Para tal, a amostra foi novamente cortada com um crivo de 3 mm numa máquina laboratorial e preparados os seus AIRs. Para análise por FT-IR, utilizou-se uma porção de amostra que continha sementes laminadas e porção de amostra sem sementes. Nos espectros obtidos, observa-se os picos característicos da gordura na porção que continha sementes. Por sua vez, o espectro da porção que não continha sementes apresenta-se idêntico ao dos AIRs das outras amostras de morango analisadas.

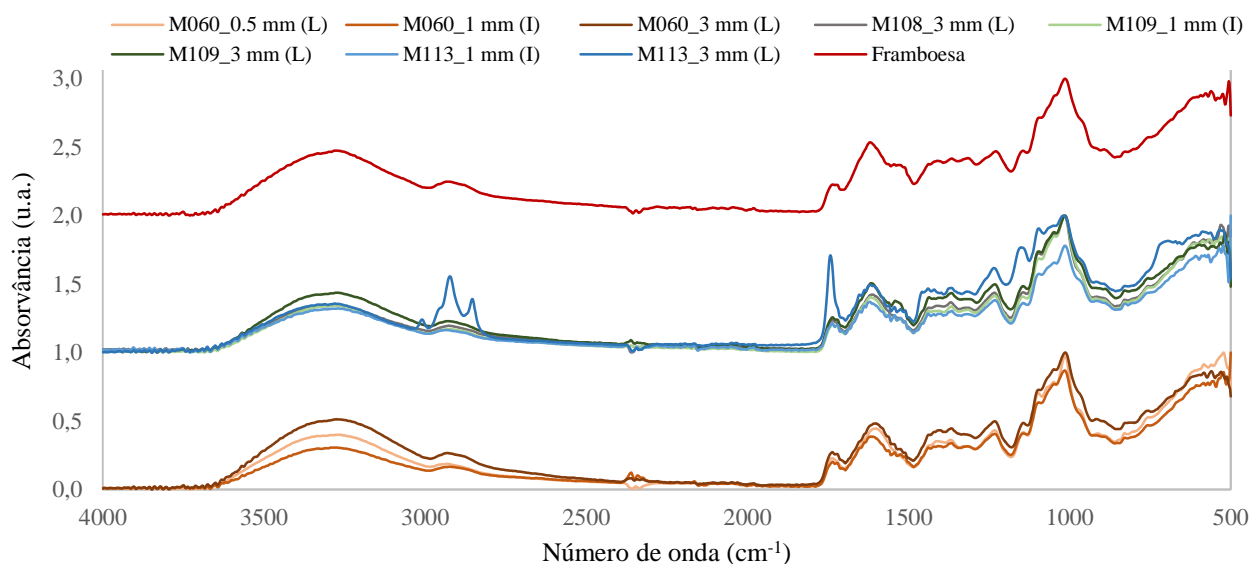


Figura 20 – Espectros de FT-IR das polpas de morango e framboesa, os espectros encontram-se normalizados entre 0 e 1. Assim, o gráfico encontra-se organizado por amostras: absorvância entre 0 e 1 amostras de morango inteiro estático (lote 060), absorvância entre 1 e 2 morango IQF (lotes 108, 109 e 113) e absorvância entre 2 e 3 amostra de framboesa. I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

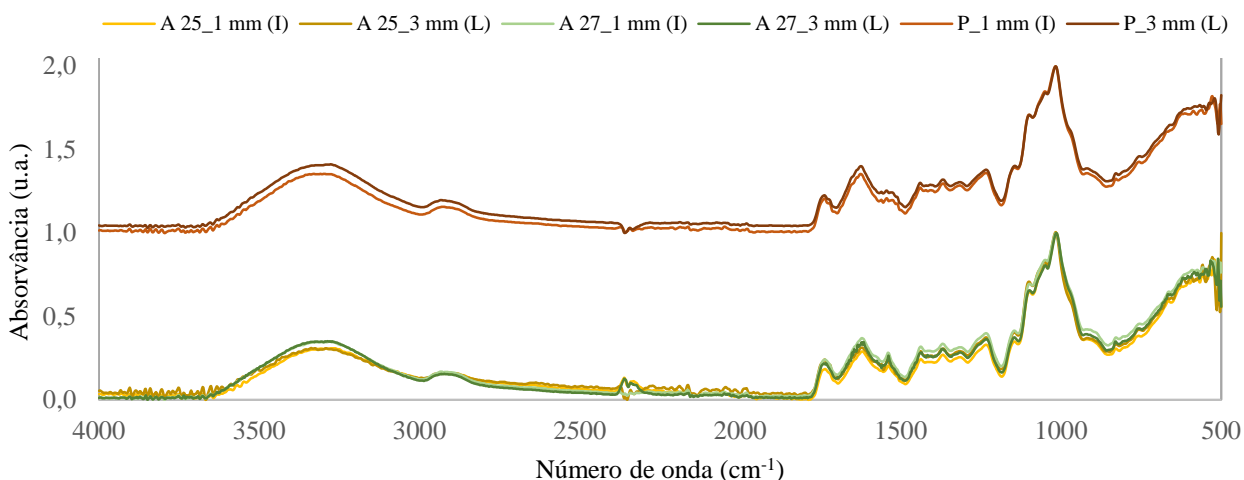


Figura 21 – Espectros de FT-IR das polpas de alperce e pêsego, os espectros encontram-se normalizados entre 0 e 1. Assim, o gráfico encontra-se organizado por amostras: absorvância entre 0 e 1 amostras de alperce (lotes 25 e 27) e absorvâncias entre 1 e 2 amostras de pêsego. I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial.

5.2.2. Análise à composição em açúcares das polpas

A composição em açúcares foi estudada para as polpas e alguns preparados de fruta obtidos no âmbito deste trabalho, permitindo assim, ter uma noção da constituição dos polissacarídeos presentes nas polpas. Para realizar este estudo obteve-se o material polimérico através da preparação dos resíduos insolúveis em álcool (AIR). Esta preparação é um método relativamente simples e rápido para obter o material polimérico, evitando a destruição dos polissacarídeos presentes na polpa e é eficiente na inativação de enzimas. Contudo, o AIR contém não só os polissacarídeos como também muitas proteínas intracelulares co-precipitadas com os polissacarídeos, ácidos nucleicos, e polifenóis [113].

Na Tabela 12 são apresentados os rendimentos obtidos na preparação dos AIRs a partir das amostras polpa de morango IQF, framboesa, alperce e pêsego. Pode observar-se pela análise da tabela que os rendimentos obtidos estão compreendidos entre 15,8 e 24,2% de massa seca. Os maiores rendimentos foram registados nas amostras de morango de 3 mm. Os menores rendimentos são registados nas amostras de alperce, pêsego e M113_1 mm.

O material polimérico obtido através da preparação dos AIRs das várias amostras de polpa foi caracterizado relativamente ao seu teor em ácidos urónicos e açúcares neutros. Os resultados encontram-se representados na Tabela 12. Pela análise desta observa-se que os açúcares totais para as polpas de morango e framboesa estão compreendidos entre 440,9 e 754,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AIR e para as polpas de alperce e pêsego os valores estão entre 523,6 e 727,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de AIR. Constatou-se

que existia uma tendência para as polpas de alperce e pêssgo possuírem ligeiramente mais açúcares totais do que as polpas de morango e framboesa. As amostras que não acompanham esta tendência são as polpas de A27_1 mm e m113_1 mm. Estando estes resultados de acordo com o trabalho desenvolvido na mesma empresa por Alves [99] em que quantificou os açúcares totais para uma polpa de morango e de alperce, obtendo os seguintes valores: 793 µg/mg de AIR e 982 µg/mg de AIR, respetivamente. Comparando os resultados obtidos por Alves com os obtidos neste trabalho, salienta-se que as polpas estudadas em 2013 tinham uma maior quantidade de açúcares do que as estudadas no presente trabalho.

Em todos os AIRs das amostras de polpa, os açúcares mais abundantes são os ácidos urónicos (30,2 a 55,5%), seguindo-se a glucose (23,4 a 37,7%). Assim, sugere-se que as amostras em estudo são constituídas principalmente por polissacarídeos pécnicos devido à elevada percentagem de ácidos urónicos quantificados nos AIR e celulose uma vez que a maior parte da glucose quantificada provém da hidrólise deste polissacarídeo [105]. A quantificação de arabinose (5,7 a 19,4%) e galactose (5,7 a 8,9%) permite inferir a presença de ramificações nos polissacarídeos pécnicos [105]. Observa-se que nas amostras de alperce e pêssgo a quantidade de resíduos de arabinose encontra-se compreendida entre 13,7 e 19,4%. Por sua vez, nas polpas de morango os valores estão compreendidos entre 5,7 e 7,1% e na polpa de framboesa, o valor obtido é de 12,3%. O grau de ramificação foi inferido pelo cálculo do rácio UA/(Ara+Gal). Assim, quanto maior for o valor deste rácio, menor será o grau de ramificação. Nas polpas de alperce e pêssgo este rácio está compreendido entre 1,2 e 1,9 e no caso das polpas de morango e framboesa está compreendido entre 2,0 e 4,3. Sugere-se que nas polpas de alperce e pêssgo os polissacarídeos pécnicos são mais ramificados do que os de morango e framboesa. Estes resultados estão de acordo com Alves [99] que quantificou os açúcares neutros e ácidos urónicos em amostras de polpa de morango e alperce, constatando que existia uma percentagem maior de arabinose nas polpas de alperce (18%) relativamente às polpas de morango (6%). Uma hipótese sugerida para explicar o porquê de na produção dos preparados de alperce e pêssgo se aplicar um maior tratamento enzimático com a PME (60 min) do que na produção dos preparados de morango (30 min) está relacionada com o facto dos polissacarídeos pécnicos no alperce e no pêssgo estarem mais ramificados, existindo um impedimento estérico maior, o que dificulta a hidrólise dos grupos metílicos presentes nas cadeias de homogalacturonanas visto que o número, a distribuição, o comprimento e a conformação das cadeias laterais, bem como a disposição dos grupos metílicos afetam a atividade da enzima [114].

Como dito anteriormente na framboesa, o tratamento enzimático durante 60 min foi mais vantajoso do que o tratamento enzimático durante 30 min. Neste caso, a explicação foi a mesma que para o alperce e pêssego, uma vez que a framboesa tem o dobro dos resíduos de arabinose quando comparada com o morango.

Tabela 12 – Composição em açúcares dos AIR das polpas de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssego (P).

Amostra	Matéria Seca (%)	Rendimento (%) ¹	Composição em Açúcares (% molar)								Açúcares totais (µg/mg de AIR)	UA (Ara + Gal)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA		
M108_3 mm (L)	9,9	24,2	1,1	0,9	7,1	11,8	2,2	8,3	37,7	30,9	440,9	2,0
M109_1 mm (I)	6,3	19,8	1,1	1,6	6,0	6,3	2,2	8,4	31,0	43,3	552,4	3,0
M109_3 mm (L)	7,7	24,0	0,9	0,8	5,7	13,0	1,5	5,7	30,3	42,1	489,3	3,7
M113_1 mm (I)	9,2	15,8	0,7	0,7	5,9	4,9	1,8	7,1	23,4	55,5	754,9	4,3
M113_3 mm (L)	9,3	21,9	1,0	0,7	6,7	10,0	2,1	7,8	31,4	40,2	484,5	2,8
F_1 mm (I)	11,6	20,3	0,7	0,5	12,3	7,9	2,2	7,3	29,6	39,5	510,3	2,0
A25_1 mm (I)	7,7	17,1	1,2	0,8	15,1	5,3	3,2	7,2	33,5	33,8	664,4	1,5
A25_3 mm (L)	8,9	17,8	1,0	0,7	16,1	6,9	3,1	6,9	29,5	35,8	629,7	1,6
A27_1 mm (I)	9,0	19,9	1,0	0,8	17,9	6,6	3,5	7,4	32,6	30,2	523,6	1,2
A27_3 mm (L)	9,5	19,4	1,0	0,6	13,7	5,7	3,2	6,5	30,9	38,4	727,0	1,9
P_1 mm (I)	5,5	18,8	0,9	1,3	19,4	6,6	1,3	8,2	28,6	33,6	606,2	1,2
P_3 mm (L)	6,1	18,9	0,9	1,1	18,6	7,2	1,2	8,9	27,2	35,1	634,1	1,3

¹ Rendimento calculado em relação à massa seca.

I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial

Para as amostras de morango do lote M060 foi realizado um estudo mais promonerizado, desta forma, estudou-se a composição em açúcares nos AIRs e em extratos de água e imidazol. Este estudo foi realizado de forma a explicar as alterações que ocorrem durante processamento das amostras.

Na Tabela 13 estão representados os rendimentos obtidos na preparação dos AIRs para a amostra M060 cortada a 1 mm num equipamento industrial e a 0,5 e 3 mm num equipamento laboratorial. Destas três amostras a polpa cortada a 1 mm foi a que apresentou um maior rendimento, 22,3%, seguindo-se da amostra de 3 mm, 18,5%, e por fim a amostra de 0,5 mm, 11,5%. Nos preparados os rendimentos obtidos foram mais baixos o que está de acordo com o facto destes serem constituídos por 85% de polpa, assim, o maior rendimento foi registado na amostra 060_1 mm, 7,2%, seguindo-se a amostra 060_0,5 mm, 6,8%, e, por fim, a amostra 060_3 mm, 6,6%. A Tabela 13 também mostra a composição em açúcares dos AIRs preparados a partir das amostras de polpa e preparado provenientes do lote 060. Começando por observar os resultados

obtidos para os açúcares totais verifica-se que a quantidade de açúcares presente nas várias amostras de polpa varia entre 436,5 e 494,4 µg/mg de AIR. No que diz respeito aos preparados em estudo, estes apresentam maior quantidade de açúcares totais do que as polpas, variando entre 655,5 a 983,4 µg/ mg de AIR, sendo que os AIR do preparado 060_0,5 mm e preparado 060_1 mm são constituídos quase na sua totalidade por açúcares, enquanto que das polpas e preparado 060_3 mm apresentam na sua constituição uma maior quantidade de material não carboidrato [113]. Os açúcares maioritários presentes são os ácidos urónicos (37,2 a 61,2 % molar) e a glucose (24,9 a 37,3 % molar). A galactose (3,5 a 9,2 % molar) e arabinose (2,4 a 7,2 % molar) foram detetadas em quantidades inferiores. Pelo cálculo do rácio UA/(Ara+Gal) nota-se que os polissacarídeos pécicos da polpa são mais ramificados do que os do preparado, esta afirmação é corroborada pela presença de uma maior quantidade de resíduos de arabinose e galactose nas polpas do que nos preparados. Esta variação pode ser explicada através do processamento a que a polpa está sujeita para originar o preparado, estando mais suscetível a reações que degradam os polissacarídeos [105], existindo a perda de açúcares neutros das suas ramificações [38, 115].

Tabela 13 – Composição em açúcares dos AIRs das amostras de polpa e preparado provenientes do lote M060.

Amostra	Matéria Seca ¹ (%)	Rendimento ² (%)	Composição em açúcares (% molar)								Açúcares totais (µg/mg de AIR)	UA (Ara + Gal)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA		
Polpa M060_1 mm	8,6	22,3	1,3	0,9	7,2	7,2	2,5	9,2	34,6	37,2	436,5	2,3
Preparado M060_1 mm	22,6	7,2	0,6	0,4	3,7	3,5	1,9	3,8	24,9	61,2	983,4	8,2
Polpa M060_0,5 mm	8,1	11,5	1,2	0,9	6,1	6,7	1,8	7,4	26,1	49,8	494,4	3,7
Preparado M060_0,5 mm	22,3	6,8	0,6	0,3	2,4	2,3	2,7	3,5	36,4	51,9	954,8	8,8
Polpa M060_3 mm	8,8	18,5	1,2	0,8	5,7	5,9	2,3	8,2	32,6	43,3	491,4	3,1
Preparado M060_3 mm	22,8	2,7	0,8	0,4	3,8	5,9	2,6	4,7	37,3	44,5	655,5	5,2

¹ Matéria seca dos preparados foi calculada com base na matéria seca obtida para as polpas, adicionando 14% que corresponde ao açúcar branco adicionado durante a produção do preparado e que fará parte da massa seca.

² Rendimento calculado em relação à massa seca.

I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial

Para os extratados de água e imidazol foram quantificados os ácidos urónicos e açúcares neutros, encontrando-se essa informação na Tabela 14. Pela análise desta verifica-se que os rendimentos obtidos nos extratos de água estão compreendidos entre 12,3 e 20,1% e nos extratos de imidazol estão entre 3,4 e 5,6%. Constatando-se que os maiores rendimentos ocorrem na extração com água. Por observação da mesma tabela, para os extratos obtidos, o valor dos açúcares

totais está compreendido entre 652,1 a 1185,8 µg/ mg de extrato. Assim, conclui-se que estes extratos eram constituídos maioritariamente por açúcares. Ainda se pode constatar que os valores dos açúcares totais são superiores a 1000 µg/ mg de extrato nos extratos de água das amostras de polpa 060_1 mm e 3 mm e preparado 060_3 mm e no extratos de imidazol de preparado 060_3 mm, sendo um valor impossível de ocorrer. Este facto está relacionado com erros de quantificação associados aos métodos utilizados. Os extratos de água e imidazol possuem uma % molar elevada de ácidos urónicos (71,4 a 85,9%), estando em concordância dado que estes extratos são ricos em polissacarídeos pécnicos. Como era de esperar os açúcares neutros mais abundantes são a arabinose (2,9 a 7,7 % molar) e a galactose (3,3 a 7,1 % molar). Neste trabalho verifica-se que tanto nos extratos de água como nos extratos de imidazol os resíduos de arabinose e galactose estavam na proporção de 1:1. Tal foi descrito por Redgwell *et al.* [116] em extratos de água obtidos a partir de AIRs de uma amostra de morango.

Tabela 14 – Composição em açúcares dos extratos de água e imidazol de polpa e preparado provenientes do lote M060.

Amostra	Extrato	Rendimento (%)	Composição em açúcares (% molar)								Açúcares totais (µg/mg de extrato)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	
Polpa M060_1 mm (I)	Água	13,7	1,0	0,3	4,9	2,6	0,5	3,8	2,3	84,6	1027,6
	Imidazol	5,6	1,5	0,3	3,7	1,7	1,0	5,0	4,5	82,1	789,1
Preparado M060_1 mm (I)	Água	14,7	1,4	0,3	7,4	3,0	0,6	6,2	6,3	74,7	788,9
	Imidazol	3,6	1,4	0,4	5,9	3,2	1,3	7,1	9,2	71,4	741,8
Polpa M060_0,5 mm (L)	Água	20,1	1,5	0,4	7,7	3,2	0,6	5,0	4,3	77,3	779,4
	Imidazol	4,7	1,6	0,3	4,6	2,5	1,0	5,1	4,8	80,1	689,0
Preparado M060_0,5 mm (L)	Água	13,4	1,4	0,3	6,4	2,9	1,1	5,6	6,9	75,5	803,0
	Imidazol	3,4	1,7	0,4	5,6	3,6	1,9	6,1	9,0	71,5	652,1
Polpa M060_3 mm (I)	Água	12,3	1,1	0,3	4,5	2,9	0,3	3,2	2,4	85,2	1133,2
	Imidazol	4,4	1,2	0,2	2,9	1,3	0,7	3,5	4,3	85,9	953,7
Preparado M060_3 mm (L)	Água	14,6	0,9	0,2	4,2	1,7	0,4	3,3	3,6	85,6	1069,6
	Imidazol	3,5	1,2	0,4	3,9	2,8	1,0	4,2	5,4	81,0	1185,8

I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial

5.2.3. Grau de metilesterificação das polpas e preparados de morango 060

O grau de metilesterificação (DM) foi determinado nos extratos de água e imidazol das amostras de polpa e preparado 060 cortadas a 1 mm num equipamento industrial e cortada a 0,5 e 3 mm num equipamento laboratorial. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos na quantificação do grau de metilesterificação. Observa-se que este está compreendido entre 0,33 e 0,38 mol de metanol/ mol de UA nos extratos de água das diversas amostras de polpa (1; 0,5 e 3 mm), não existindo grandes variações do mesmo. Podendo-se, assim, sugerir que a transformação da fruta em polpa nas amostras de morango do lote M060 não afeta o grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécticos solúveis em água. No que diz respeito aos polissacarídeos pécticos solúveis em água presentes nas amostras de preparado (1; 0,5 e 3 mm) estes têm um grau de metilesterificação de 0,16 mol de metanol/ mol de UA. Assim, constata-se que existe uma diminuição do grau de metilesterificação dos extratos de água referentes às amostras de polpa em comparação com os extratos de água referentes às amostras de preparado, estando este facto relacionado com a atividade desta enzima [7, 8, 34].

Os polissacarídeos pécticos presentes no extrato de imidazol, correspondentes às amostras de polpa, têm um grau de metilesterificação compreendido entre 0,18 a 0,26 mol metanol/mol UA. No caso dos extratos de imidazol das amostras de preparado, apenas foi detetado uma quantidade vestigial de metanol. Assim, sugere-se que os polissacarídeos pécticos dos extratos de imidazol se encontram quase totalmente desesterificados. Portanto, pode-se deduzir que a PME é mais eficaz nos polissacarídeos pécticos dos extratos de imidazol do que nos presentes no extrato de água, levando a que estes polissacarídeos pécticos fiquem desesterificados quase na sua totalidade. Na Tabela 15 também está representado o rácio UA/(Ara+Gal), verificando-se que as amostras que estão mais desramificadas são a polpa e preparado realizadas a partir da amostra M060_3 mm. Nesta amostra, sugere-se que a enzima PME tem menos impedimentos estéricos para remover os grupos metílicos das moléculas de ácido D-galacturónico [114].

Tabela 15 – Grau de metilesterificação nos extratos de água e imidazol obtidos a partir do AIR das amostras de polpa e preparado M060 com corte de 1, 0,5 e 3 mm..

Amostra	Extrato	UA (Ara + Gal)	Grau de metilesterificação (mol de metanol/ mol de UA)
Polpa M060_1 mm (I)	Água	9,78	0,33
Preparado M060_1 mm (I)		5,49	0,16
Polpa M060_0,5 mm (L)		6,10	0,37
Preparado M060_0,5 mm (L)		6,28	0,16
Polpa M060_3 mm (L)		11,04	0,38
Preparado M060_3 mm (L)		11,40	0,16
Polpa M060_1 mm (I)	Imidazol	9,35	0,22
Preparado M060_1 mm (I)		5,47	Vestigial
Polpa M060_0,5 mm (L)		8,23	0,26
Preparado M060_0,5 mm (L)		6,11	Vestigial
Polpa M060_3 mm (L)		13,47	0,18
Preparado M060_3 mm (L)		9,91	Vestigial

I – fruta transformada em polpa a nível industrial; L – fruta transformada em polpa a nível laboratorial

5.3. Avaliação das características visuais e estabilidade das polpas e preparados de fruta ao longo do tempo de amostragem

Durante os vários dias de amostragem das polpas e preparados foram tidas em consideração algumas características visuais. Assim, avaliou-se a presença de sementes nas polpas de morango notando-se que na polpa cortada a 0,5 e a 1 mm não existiam sementes. Isto acontece devido ao tamanho dos orifícios do crivo serem pequenos e as sementes são retidas na totalidade pela máquina de corte. Por sua vez, nas polpas cortadas a 3 mm existia a presença de muitas sementes, a grande maioria eram sementes inteiras e as restantes estavam laminadas. A avaliação da presença de sementes nas polpas de morango é muito importante, uma vez que nem todos os consumidores gostam de ver as sementes nos produtos finais, especialmente quando os iogurtes são consumidos pelas crianças.

Comparando as polpas com diferentes granulometrias observou-se que as polpas mais consistentes eram as cortadas a 3 mm, que se caracterizavam por ter uma maior quantidade de

sólidos em suspensão. Também foi avaliada a capacidade da polpa manter um aspeto uniforme ao longo do tempo. Assim, verificou-se que ocorria a separação de fases (polpa na parte de cima do copo e água na parte de baixo) verificando-se que no dia da sua preparação a polpa mantinha um aspeto uniforme. Porém, com o passar do tempo a uniformidade da polpa acabava por se perder. Esta característica observa-se nas amostras de morango 060, 108 e 109_1 mm, framboesa, alperce 25_1 mm e pêsego (Tabela 16). Na polpa congelada ocorria uma separação de fases mais acentuada dado que a congelação afeta as propriedades da polpa devido a formação de cristais de gelo que interferem com a sua textura [107]. Notando-se que muitas amostras passavam a ter uma separação de fases superior a 40%, este facto foi observado nas amostras de morango 060 cortada a 0,5 e 3 mm e 109_1 mm, framboesa e alperce 25_1 mm. Separação de fases inferiores a 15% foram observadas nas amostras 060_1 mm, 109_3 mm e 113 cortada a 1 e 3 mm.

No caso dos preparados não se pretendia obter uma amostra com um aspeto gelificado, desejava-se que esta tivesse uma textura adequada e que os componentes da polpa apresentassem adesividade ao longo do tempo. Observou-se que a gelificação ocorria maioritariamente nas amostras de morango (Tabela 16) Nos preparados interessava também visualizar se ocorria sinerese, ou seja, a expulsão de água do gel formado pelos polissacarídeos pécicos na presença de cálcio. Nos preparados de morango verificou-se a ocorrência de sinerese em várias amostras: morango 060_3 mm e 113 cortada a 1 e 3 mm a partir do dia 20 e preparado 108_3 mm no dia 60. Na última amostra a probabilidade de ocorrer sinerese era bastante elevada uma vez que a própria polpa ficava com um aspeto gelificado e observava-se uma camada de água à superfície da mesma. Nos preparados de framboesa e alperce 27_1 mm não ocorreu sinerese, porém existiu uma separação de fases, ou seja, o preparado não se encontrava uniforme uma vez que não conseguiu manter em suspensão os componentes da polpa. No caso dos outros preparados de alperce, ocorreu sinerese na amostra A25_3 mm. Por fim, nos preparados de pêsego não existiu a ocorrência de sinerese. Estes dados encontram-se sumariados na Tabela 16.

Tabela 16 – Características visuais das polpas e preparados de morango (M), framboesa (F), alperce (A) e pêssgo (P) ao longo do tempo.

Dia Amostra	Polpa				Preparado				
	0	1	2	Cong.	1	7	20	40	60
M060 1 mm (I)	-	(-5)	(-5)	(-5)	-	G	G	G	G
M060 0,5 mm (L)	-	-	(-5)	(+40)	-	G	G	G	G
M060 3 mm (L)	-	-	(+15)	(+40)	-	G	G S	G S	G S
M108 3 mm (L)	-	-	(+15)	(+15)	-	G	G	G	G S
M109 1 mm (I)	-	(-15)	(+40)	(+40)	-	G	G	G	G
M109 3 mm (L)	-	-	-	(-5)	-	-	-	-	-
M113 1 mm (I)	-	-	-	(-5)	-	G	G S	G S	G S
M113 3 mm (L)	-	-	G S	(-5)	G	G	G S	G S	G S
Framboesa	-	(-5)	(-5)	(+40)	-	-	-	(-15)	(-15)
A 25 1 mm (I)	-	(+40)	(+40)	(+40)	G	G	G	G	G
A 25 3 mm (L)	-	-	-	(+15)	-	G S	G S	G S	G S
A27 1 mm (I)	-	-	-	(+15)	-	-	-	-	(-15)
A 27 3 mm (L)	-	-	-	(+15)	-	-	-	-	-
P 1 mm (I)	-	(-5)	(-5)	(+15)	-	-	-	-	-
P 3 mm (L)	-	-	(-15)	(+15)	-	-	-	-	-

Legenda: (-5) Separação de fases inferior a 5% $\left(\frac{Polpa}{Água}\right)$

(-15) Separação de fases entre 5 e 15% $\left(\frac{Polpa}{Água}\right)$

(+15) Separação de fases superior a 15% $\left(\frac{Polpa}{Água}\right)$

(+40) Separação de fases superior a 40% $\left(\frac{Polpa}{Água}\right)$

S – Sinerese

G – Gelificado

- Nada foi verificado

I – fruta transformada em polpa a nível industrial

L – fruta transformada em polpa a nível industrial

5.4. Avaliação da estabilidade da base láctea (iogurte)

Os preparados de fruta desenvolvidos no âmbito deste projeto tinham por objetivo serem incorporados em iogurte. Para tal, foi necessário observar como se comportavam as bases de iogurte quando o preparado era adicionado. As bases lácteas às quais foram incorporados os preparados de fruta foram iogurte batido e grego açucarados a 8%. Realizaram-se três incorporações utilizando as seguintes dosificações de 9,4%, 20% e 30% em relação à massa de iogurte. Assim, para cada dosificação está-se a incorporar em iogurte uma percentagem de polpa de fruta de 8%, 17% e 25,5%, respetivamente. O comportamento dos iogurtes foi acompanhado nos primeiros dias após a incorporação e passados 22 dias depois da mesma. A escolha deste tempo de acompanhamento do iogurte deve-se ao facto destes terem de validade 22 dias. Ao final dos 22 dias, foi possível verificar a presença de uma camada de água à superfície do iogurte, sendo esta a desestabilização mais conhecida associada a este tipo de produtos. Esta perturbação do iogurte está relacionada com a expulsão das proteínas do soro de leite da rede tridimensional que forma o iogurte e que lhe confere as propriedades que todos os consumidores apreciam. A ocorrência desta camada de água à superfície não é do agrado do consumidor [94].

Também foi possível observar outra desestabilização associada aos iogurtes, esta caracteriza-se pelo aparecimento de um aspeto granuloso, sendo visível logo após a incorporação. Este aspeto muda a sensação de paladar que se tem do produto, deixando de apresentar uma textura macia e homogênea, sentindo-se que os componentes do mesmo não estão ligados. O aspeto com que a base láctea ficou está representado na Figura 20 c), na Figura 20 a) é mostrado o aspeto da base láctea sem a incorporação de preparado e na Figura 20 b) a base láctea com a incorporação de preparado a 9,8%, o iogurte não fica talhado. A esta desestabilização dá-se o nome na empresa de talhamento do iogurte. Este ocorreu maioritariamente nas amostras de morango quando se aplicavam os preparados a 20 e a 30%, sendo o grau de talhamento maior quando o preparado era incorporado a 30%. A única amostra na qual não se observou esta desestabilização foi na amostra M109_3 mm. No caso dos preparados de framboesa, alperce e pêssêgo foi possível observar este comportamento no preparado de framboesa_30 min e alperce 25_1 mm. Na framboesa foi possível observar esta desestabilização nas incorporações a 20 e 30%, enquanto no caso do alperce só se verificou a 30%. No entanto, a desestabilização nestes casos era menor do que nos preparados de morango. Comparando a amostra de framboesa_30 min com a amostra de alperce 25_1 mm, o talhamento era maior na amostra de framboesa. Observou-se que com o decorrer do tempo não ocorria o talhamento do iogurte, esta desestabilização apenas ocorria no momento da incorporação e não existia evolução do talhamento ao longo do tempo, ou seja, não existia um agravamento deste. Também se constatou que à medida que os preparados, que causavam o talhamento, iam envelhecendo, quando eram aplicados novamente em iogurte o talhamento era maior, apresentando um aspeto mais granuloso. Ainda foi visível que quanto maior a dose incorporada, maior era a probabilidade de ocorrer o talhamento.



Figura 22 – Imagens de iogurte: a) iogurte batido açucarado a 8%, b) um iogurte batido açucarado a 8% com o preparado 060_1 mm incorporado a 9,8% e c) um iogurte batido açucarado a 8% com o preparado 060_1 mm incorporado a 30 %.

De forma a investigar quais os agentes que estariam na origem do talhamento do iogurte foram realizados vários ensaios. Assim, excluíram-se as hipóteses de ser a água, a presença de PME ativa

nos preparados e os ácidos orgânicos, uma vez que as soluções de água, água com PME, PME e água com ácido cítrico e ácido ascórbico quando incorporadas em iogurte não o talhavam. Ainda para investigar se a PME estaria na origem do talhamento, produziu-se um preparado de morango M060_3 mm com uma condição de pasteurização diferente (95 ° C durante 5 min), porém quando aplicado em iogurte este preparado continuava a talha-lo tal como o preparado com a condição de pasteurização inicial (85 ° C durante 10 min).

De forma a pesquisar se o agente desestabilizador do iogurte se encontrava só no preparado ou também se encontrava nas polpas que deram origem a este. Foram realizados dois controlos para as amostras que talhavam o iogurte: polpa pasteurizada e preparado sem PME. Quando os controlos foram incorporados no iogurte verificou-se que não ocorria o talhamento do mesmo, à exceção da amostra M113_3 mm em que existiu o talhamento nos dois controlos, nas dosificações de 20 e 30%. Anteriormente, sugeriu-se que esta amostra tinha naturalmente os polissacarídeos pécticos desesterificados devido ao seu comportamento reológico. Desta forma, considerou-se que o agente desestabilizador do iogurte seria os polissacarídeos pécticos desesterificados. Pelo que é referenciado na literatura, esta hipótese começou a ganhar mais consistência, uma vez que esta desestabilização foi observada em iogurtes fortificados com fibra. Assim, esta desestabilização foi observada na patente publicada por Reddy [117]. Este autor observou que aquando da adição do preparado de fruta fortificado com fibra comercial de maçã e do preparado de fruta fortificado com fibra comercial de pera, o iogurte adquiria um aspeto granuloso. No entanto, este era maior utilizando o preparado de pera em comparação com o preparado de maçã. Reddy ainda realizou a incorporação dos preparados de fruta sem a adição de fibra e verificou que o iogurte não apresentava um aspeto granuloso. Fernandez-Garca *et al.* [118] desenvolveu iogurtes fortificados com fibra diatéctica insolúvel utilizando cinco fontes de fibra diferentes: soja, arroz, aveia, milho e beterraba. Observou que os iogurtes apresentavam uma textura granulosa, à exceção do que foi fortalecido com fibra de aveia.

Para provar que seriam os polissacarídeos pécticos que estariam na origem do talhamento do iogurte foram realizadas várias soluções de forma a reproduzir a composição geral do preparado. Os únicos componentes da composição do preparado que não se colocaram nestas soluções foram a polpa de fruta e a enzima PME. Para a realização destas soluções utilizaram-se os três tipos de pectinas comerciais: pectina LM, pectina LM amidada e pectina HM. As cinco soluções de composição conhecida estão descritas no tópico 4.4 do capítulo Materiais e Métodos. A Tabela 17

apresenta qual a influência que cada tipo de solução de pectina tinha na base láctea. Desta forma, constatou-se que as soluções só com pectina LM, LMA e LM+HM talhavam o iogurte. Por sua vez, a solução de pectina LM na presença de cálcio e a solução de pectina HM não talhavam o iogurte. Assim, sugere-se que o talhamento do iogurte esteja associado à interação dos polissacarídeos pécticos desesterificados com as caseínas do leite. Propõem-se esta hipótese com base no que é descrito na patente publicada por Pedersen [119] em que refere que os agentes gelificantes que têm carga negativa, tais como as pectinas e as carragenanas, reagem com a caseína que tem carga positiva abaixo do seu ponto isoelétrico (pH 4,6). Assim, os agentes gelificantes não formam gel com o iogurte, porém levam a formação de co-precipitados com a caseína. Na literatura é descrito que a pectina HM é utilizada como agente estabilizante do iogurte, a estabilização ocorre pela ligação das partes carregadas negativamente das pectinas às moléculas de caseína carregadas positivamente. Por sua vez, as zonas das pectinas que estão metilesterificadas e ramificadas impedem a agregação pectina-caseína, interagindo estas zonas com o solvente (soro) [120], justificando-se desta forma porque não ocorreu o talhamento do iogurte na solução que continha pectina HM. Por sua vez, as pectinas LM e LMA possuem mais grupos carboxílicos carregados negativamente do que as pectinas HM, existindo assim uma maior interação entre as pectinas LM e as caseínas. Na literatura é referido que as pectinas LM são adicionadas ao iogurte com o objetivo de mudar a sua consistência e prevenir a sinerese, porém estas têm que ser adicionadas em baixa quantidade uma vez que porções superiores a 0,20% conduzem a uma textura granulosa e a uma diminuição da viscosidade [81]. Neste caso, a solução tinha 0,28% de pectina justificando-se assim o talhamento do iogurte, a percentagem de pectina está de acordo com a percentagem de polissacarídeos pécticos presentes na amostra em estudo. Na solução de pectina LM na presença de cálcio não ocorreu o talhamento do iogurte uma vez que a pectina encontrava-se saturada com o cálcio, não interagindo com as caseínas. A solução de pectina LM+HM foi realizada com base no que é descrito na patente de Malone [121]. Assim, este autor para desenvolver um iogurte gelificado utilizou pectinas comerciais LM e HM. A função da pectina LM era conferir ao iogurte um aspeto gelificado, por sua vez, a pectina HM foi utilizada com o propósito de proteger as caseínas. No presente trabalho a solução realizada tinha uma proporção de pectina LM e HM de 1:1, esta solução causou o talhamento do iogurte. Admite-se que um estudo pormenorizado das proporções a usar de pectina LM e HM poderá chegar à solução que não talhe o iogurte. Este estudo é importante uma vez que se pode produzir um preparado em

que uma percentagem da polpa de fruta seja tratada com a enzima PME e restante percentagem seja só adicionada no final do tratamento enzimático. Outra solução a investigar passa por realizar tratamentos enzimáticos às polpas com uma duração inferior, especialmente nos preparados de morango onde se verificou neste estudo que o tratamento enzimático de 30 min era muito longo uma vez que os preparados tinham um aspeto gelificado. Assim, quanto menor for o tratamento enzimático, maior será o grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécticos, o que conduzirá a uma menor interação polissacarídeo-caseína. Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Pereyra *et al.* [122]. Este autor estudou a estabilização de dispersões de caseína com pectinas de baixo e alto grau de metilesterificação, concluindo que a pectina HM foi mais efetiva a melhorar a estabilidade da dispersão de caseína do que a pectina LM. Justificando esta ocorrência com facto de nas pectinas LM existirem mais grupos carboxílicos livres, conduzindo a uma maior interação entre as pectinas e as caseínas. Por sua vez, a baixa interação da pectina HM com caseína e a interação da parte ramificada e metilesterificada com o solvente (soro) tende a aumentar a estabilidade da dispersão.

Tabela 17 – Resultados da incorporação de soluções de pectina comerciais em iogurte batido.

	Soluções de pectina comercial de composição conhecida				
	LM ¹	LM+Ca ²⁺	LMA	HM	LM+HM
Talhamento do iogurte	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Observações visuais	Textura granulosa;	Textura lisa; Presença de fragmentos de gel que não se misturam com o iogurte;	Textura granulosa; Menor talhamento do que a LM;	Textura lisa;	Textura granulosa;

Para comprovar que existia uma interação entre as caseínas e os polissacarídeos pécticos foi realizada uma análise de FT-IR a um precipitado obtido a partir de um preparado de fruta e a um precipitado obtido a partir de um iogurte talhado após a incorporação do preparado de fruta. Os espectros obtidos para estas amostras estão representados na Figura 23, pela sua observação, verifica-se que o espectro correspondente ao preparado de fruta assemelha-se aos espectros anteriormente apresentados para os AIRs das amostras de polpa de fruta (Figura 20 e 21 no tópico

5.2.1). Estando de acordo com o facto do preparado de fruta ser constituído maioritariamente por polpa (85%), situando-se os picos com maior intensidade na região de *fingerprint* dos polissacarídeos pécnicos ($1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$). Por sua vez, o espectro correspondente ao precipitado de iogurte apresenta dois picos intensos a 1626 e 1531 cm^{-1} . Estes sugerem a presença de proteína na amostra, uma vez que o pico 1626 cm^{-1} corresponde às amidas I [123, 124] e a 1531 cm^{-1} às amidas II [124]. Também é possível observar a deteção de picos a 2917 (grupo CH_2), 2849 (grupo CH_2) e 1740 (grupo C=O de ésteres) cm^{-1} . Estes picos correspondem aos grupos R hidrofóbicos dos aminoácidos. Estes resultados estão em concordância com o facto de os iogurtes serem constituídos por um elevado teor proteico, estando de acordo com os dados da USDA (*United States Department of Agriculture*) [125] para iogurte simples feito a partir de leite desnatado, a quantidade de proteína deverá ser $5,73\text{ g}/100\text{ g}$ de iogurte, sendo a sua percentagem de água de $85,23\text{ g}/100\text{ g}$ de iogurte. Também foi visível, no espectro do precipitado de iogurte, a zona de *fingerprint* dos polissacarídeos pécnicos ($1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$), porém este é menos intenso do que o do precipitado de fruta, uma vez que a quantidade de polissacarídeos pécnicos no precipitado de iogurte é menor em comparação com a quantidade de proteína. Assim, com base no que é descrito na literatura e nos resultados obtidos neste trabalho sugere-se que os grupos carboxílicos carregados negativamente dos polissacarídeos pécnicos presentes nos preparados interagem com as caseínas do iogurte, causando o aspeto granuloso.

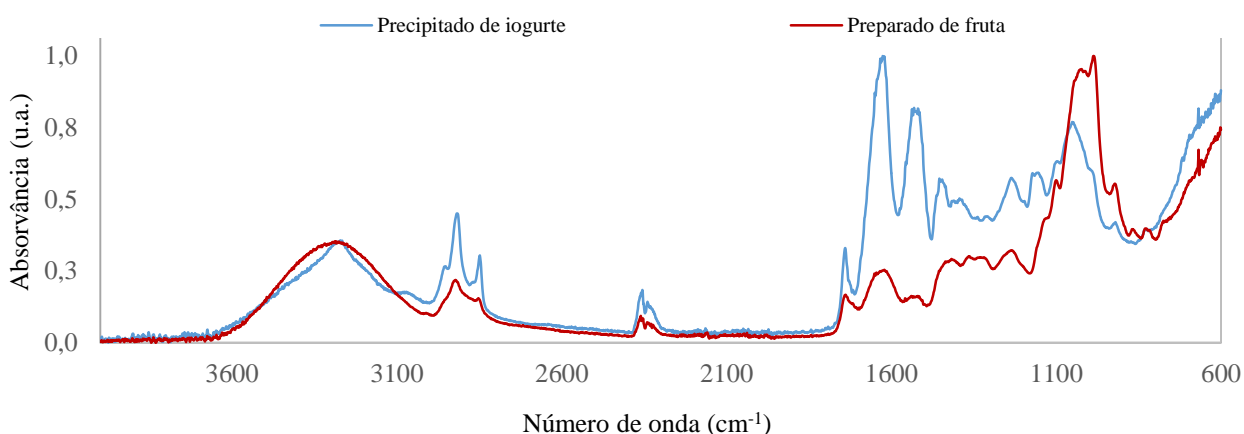


Figura 23 – Espectros de FT-IR correspondentes ao iogurte com preparado incorporado (linha azul) e preparado de fruta (linha vermelha). Os espectros de precipitado de iogurte e preparado de fruta encontram-se normalizados entre 0 e 1.

A hipótese sugerida para explicar que a desestabilização tenha ocorrido com maior frequência nas amostras de preparado de morango (todas as amostras, à exceção 109_3 mm) está relacionado com o facto das amostras de morango terem um grau de ramificação menor quando comparadas com as amostras de framboesa, alperce e pêsego. Esta afirmação tem por base a informação presente na Tabela 12. Assim, não existe um talhamento com tanta frequência nas amostras de alperce e pêsego uma vez que o grau de ramificação impede que as cargas negativas dos polissacarídeos pécticos interatuem com as cargas positivas das caseínas do iogurte [120]. Outro fator que pode conduzir a um grau de talhamento maior é o facto dos polissacarídeos pécticos presentes nos preparados se encontrarem mais desramificados do que os das polpas (Tabela13). Assim, a interação polissacarídeos pécticos-caseína é promovida pela metil desesterificação da polpa do preparado durante o tratamento enzimático bem como pela desramificação do preparado que poderá ocorrer durante a produção deste produto.

6. Conclusão

Os polissacarídeos pécticos são frequentemente adicionados aos produtos alimentares para melhorar as suas propriedades sensoriais. A principal característica destes polímeros é a sua capacidade de formarem gel de duas formas distintas: na presença de cálcio ou na presença de açúcar e meio ácido. Sendo um dos aditivos mais atrativos da indústria alimentar. Neste trabalho pretendia-se aproveitar as propriedades dos polissacarídeos pécticos presentes naturalmente nas polpas de fruta. No entanto, estes por norma têm um grau de metilesterificação que não permite a formação de gel na presença de cálcio. Para contornar este problema, utilizou-se um auxiliar tecnológico a pectina metil esterase que promove a metil desesterificação destes polímeros.

Os tratamentos enzimáticos aplicados às polpas de fruta foram escolhidos com base em trabalhos realizados anteriormente na empresa. Assim, nas amostras de morango o tratamento realizado foi de 30 min e nas amostras de alperce e pêssago de 60 min. Na amostra de framboesa realizaram-se dois tratamentos enzimáticos de 30 e 60 min, verificando-se que o tratamento mais adequado seria o de 60 min, porém o preparado obtido caracterizava-se por ser muito fluido. A diferença no tempo de atuação da enzima nas diversas polpas de fruta está relacionada com o facto dos polissacarídeos pécticos do morango serem menos ramificados do que os presentes nas polpas de framboesa, alperce e pêssago. Assim, é possível que existam menos impedimentos estéricos para a enzima atuar, uma vez que o número, a distribuição, o comprimento e a conformação das cadeias laterais podem afetar a atividade da enzima. Neste trabalho, observou-se que o tratamento enzimático para o morango de 30 min seria muito longo. Portanto, seria benéfico experimentar nestas polpas um tratamento mais curto entre 15 a 25 min. No caso do alperce 25 granulometria 1 e 3 mm, o tratamento enzimático também é muito longo, produzindo preparados com um aspeto gelificado e que quase não apresentam espalhamento no viscosímetro de *Bostwick*. Por conseguinte, um tratamento entre 20 a 50 min seria, possivelmente, mais favorável. No caso do pêssago, o preparado produzido a partir da polpa cortada a 1 mm não apresentou benefícios após a atuação da enzima PME, o único efeito visível foi a estabilidade da fase dispersa.

No presente estudo, conclui-se que o tratamento com a PME permite que as polpas adquiram viscosidade, sendo portanto efetiva a sua atividade de desesterificação dos polissacarídeos pécticos. Todavia, existiram preparados em que não ocorreu um aumento da viscosidade, esta manteve-se da polpa de fruta para o preparado, verificando-se na polpa M060_1 mm (I), M109_3mm (L), A27_3 mm (L) e P_1 mm (I). Apesar de não ter existido uma diminuição da

fluidez, o tratamento com a enzima PME permitiu melhorar a estabilidade da fase dispersa e que os preparados tivessem um aspeto uniforme. A efetividade da enzima na diminuição do grau de metilesterificação dos polissacarídeos pécticos foi comprovada pela sua determinação no lote M060 nas suas polpas e preparados (0,5, 1 e 3 mm), uma vez que existiu a diminuição do grau de metilesterificação tanto nos extratos de água como nos extratos de imidazol preparados por extração a partir do AIR das amostras. Observando-se que esta apresentou uma maior atividade nos extratos de imidazol, uma vez que nos preparados a quantidade de metanol presente era vestigial. A determinação do grau de metilesterificação permitiu afirmar que diferentes transformações da fruta em polpa não afetam o grau de metilesterificação da amostra.

No caso do morango e do alperce como foram utilizados vários lotes, observou-se uma grande variabilidade entre os produtos obtidos, uma vez que a composição da polpa é variável de lote para lote, conduzindo à observação de comportamentos reológicos diferentes nos vários preparados em estudo. Também o facto das polpas serem preparadas a nível industrial ou laboratorial afeta as características dos preparados formados. Na transformação industrial existem mais desperdícios do que na transformação laboratorial.

Na incorporação dos vários preparados em iogurte observou-se que alguns desestabilizavam o produto, após a aplicação do preparado, ficando com um aspeto granuloso que mudava totalmente o paladar. A ocorrência deste aspeto parece estar associada aos polissacarídeos pécticos desesterificados presentes no preparado. Neste trabalho sugeriu-se que esta destabilização estaria associada à interação dos polissacarídeos pécticos desesterificados com as caseínas, conduzindo esta interação à destabilização da base láctea. O talhamento ocorre mais frequentemente nas amostras de morango devido ao facto de possuírem um grau de ramificação menor quando comparadas com as amostras de framboesa, alperce e pêssago. Sugerindo-se que a ramificação tem um efeito protetor, uma vez que vai dificultar as interações polissacarídeo-proteína.

7. Trabalho Futuro

Como trabalho futuro sugere-se a produção de preparados de fruta em que parte da polpa de fruta seja tratada com PME e a restante percentagem seja adicionada no final do tratamento enzimático. Sugere-se este estudo uma vez que os polissacarídeos pécticos com alto grau de metilesterificação não reagem com a base láctea. No entanto é necessário determinar a proporção certa entre polpa tratada com PME e polpa não tratada com PME, para que o preparado adquira a textura adequada e quando incorporado no iogurte, em dosificações elevadas, não provoque a desestabilização do mesmo.

Uma forma rápida de saber se a polpa que irá ser usada poderá dar origem a um preparado que leve ao talhamento do iogurte, é proceder a uma pasteurização de 100 g de polpa utilizando o binómio temperatura/tempo usado na produção dos preparados. Depois do arrefecimento da polpa, aplicar em iogurte com uma dosificação de 30 ou 50%. Se ocorrer o talhamento do iogurte quer dizer que esta polpa tem um baixo grau de metilesterificação e não poderá ser utilizada para realização dos preparados *FruitOnly*.

Observou-se neste trabalho que possivelmente o grau de ramificação dos polissacarídeos pécticos das polpas de fruta tem um efeito protetor sobre a base láctea. Assim, quando são adicionados aos iogurtes polissacarídeos pécticos muito ramificados não existe tanta probabilidade de ocorrer o talhamento do iogurte. Desta forma, propõe-se o desenvolvimento de um método gravimétrico que consiste na dispersão das polpas em etanol, seguido de uma filtração. A massa do resíduo final será maior se se estiver na presença de polissacarídeos pécticos com baixa ramificação ou menor se se estiver na presença de polissacarídeos pécticos com elevada ramificação uma vez que os polissacarídeos pécticos muito ramificados vão ser mais solúveis em etanol do que os menos ramificados.

Referências

1. N.C. Carpita and D.M. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 1993, 3(1), 1-30.
2. S. Wolf; G. Mouille, and J. Pelloux, Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2009, 2(5), 851-860.
3. M.D. Brownleader; P. Jackson; A. Mobasheri; A.T. Pantelides; S. Sumar; M. Trevan, and P.M. Dey, Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1999, 39(2), 149-164.
4. Y.-H. Yoo; S. Lee; Y. Kim; K.-O. Kim; Y.-S. Kim, and S.-H. Yoo, Functional characterization of the gels prepared with pectin methylesterase (PME) - treated pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009, 45(3), 226-230.
5. W.G. Willats; L. McCartney; W. Mackie, and J.P. Knox, Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Cell Walls*, 2001, 47, 9-27.
6. B.L. Ridley; M.A. O'Neill, and D. Mohnen, Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 2001, 57(6), 929-967.
7. D.R. Kashyap; P.K. Vohra; S. Chopra, and R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 2001, 77(3), 215-227.
8. R.S. Jayani; S. Saxena, and R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 2005, 40(9), 2931-2944.
9. K.T. Inngjerdingen; T.R. Patel; X. Chen; L. Kenne; S. Allen; G.A. Morris; S.E. Harding; T. Matsumoto; D. Diallo, and H. Yamada, Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*, 2007, 17(12), 1299-1310.
10. D.E. Ngouémazong; F.F. Tengweh; T. Duvetter; I. Fraeye; A. Van Loey; P. Moldenaers, and M. Hendrickx, Quantifying structural characteristics of partially de-esterified pectins. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(3), 434-443.
11. K.H. Caffall and D. Mohnen, The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(14), 1879-1900.

12. D. Mohnen, Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3), 266-277.
13. C. Nunes; S.M. Rocha; J. Saraiva, and M.A. Coimbra, Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64(2), 306-311.
14. V. Prasanna; T. Prabha, and R. Tharanathan, Fruit ripening phenomena - an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, 47(1), 1-19.
15. J. Zandleven; S.O. Sørensen; J. Harholt; G. Beldman; H.A. Schols; H.V. Scheller, and A.J. Voragen, Xylogalacturonan exists in cell walls from various tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 2007, 68(8), 1219-1226.
16. W.G.T. Willats; J.P. Knox, and J.D. Mikkelsen, Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17(3), 97-104.
17. M. Martínez-Sanz; M.J. Gidley, and E.P. Gilbert, Application of X-ray and neutron small angle scattering techniques to study the hierarchical structure of plant cell walls: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 125, 120-134.
18. R. Goldberg; C. Morvan; A. Jauneau, and M. Jarvis, Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. *Progress in Biotechnology*, 1996, 14, 151-172.
19. F. Micheli, Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(9), 414-419.
20. A.M. Stephen, G.O. Phillips and P.A. Williams, Food polysaccharides and their applications. Second ed: CRC Press: 2006.
21. B.R. Thakur; R.K. Singh; A.K. Handa, and M. Rao, Chemistry and uses of pectin - a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1997, 37(1), 47-73.
22. F. Liners; J.-F. Thibault, and P. Van Cutsem, Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiology*, 1992, 99(3), 1099-1104.

23. G.A. Luzio and R.G. Cameron, Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methylesterase from citrus: Part II. Structure - function analysis. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 71(2), 300-309.
24. D. Powell; E. Morris; M. Gidley, and D. Rees, Conformations and interactions of pectins: II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 155(4), 517-531.
25. I. Braccini and S. Pérez, Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2001, 2(4), 1089-1096.
26. I. Fraeye; T. Duvetter; E. Doungra; A. Van Loey, and M. Hendrickx, Fine-tuning the properties of pectin - calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21(5), 219-228.
27. G.O. Phillips and P.A. Williams, Handbook of hydrocolloids. 2009: Elsevier.
28. A. Imeson, Food stabilisers, thickeners and gelling agents. 2011: John Wiley & Sons.
29. C. Nunes, Efeito do processamento nas características físico-químicas da ameixa d'elvas - Alterações ao Nível dos Polissacarídeos das Paredes Celulares, Enzimas, Aroma e Textura. Tese de doutoramento in *Departamento de química*. 2008, Universidade de Aveiro: Aveiro.
30. I.C.M. Dea, Industrial polysaccharides. *Pure and Applied Chemistry*, 1989, 61(7), 1315-1322.
31. Commission Directive No. 98/86/EC of 11 November 1998 amending Commission Directive No. 96/77/EC laying down specific purity criteria on food additive other than colours and sweeteners. *Official Journal of the European Communities* No. L334/1 of 9 December 1998.
32. Cargill - Food and Beverages Ingredients, Regulatory status [Online]. Available: <https://www.cargillfoods.com/emea/en/products/hydrocolloids/pectins/regulatory-status/index.jsp>, accessed: 26-Dez-2014.
33. IPPA - International Pectin Producers Association, Safety and Legal Status of Pectins [Online]. Available: <http://www.ippa.info/safety.htm>, accessed: 26-Dez-2014.

34. I. Alkorta; C. Garbisu; M.J. Llama, and J.L. Serra, Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 1998, 33(1), 21-28.
35. D. Kashyap; P. Vohra; S. Chopra, and R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 2001, 77(3), 215-227.
36. G. Aguilar and C. Huitrón, Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnology Letters*, 1990, 12(9), 655-660.
37. V.E. Shevchik and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, PaeX, a second pectin acetylsterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(10), 3091-3100.
38. D. Sila; S. Van Buggenhout; T. Duvetter; I. Fraeye; A. De Roeck; A. Van Loey, and M. Hendrickx, Pectins in processed fruits and vegetables: Part II - Structure - function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8(2), 86-104.
39. G. Kaur; S. Kumar, and T. Satyanarayana, Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology*, 2004, 94(3), 239-243.
40. M. Gailing; A. Guibert, and D. Combes, Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. *Bioprocess Engineering*, 2000, 22(1), 69-74.
41. I. Revilla and G.S. José, Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 2003, 38(1), 29-36.
42. A. Fayyaz; B. Asbi; H. Ghazali; Y. Che Man, and S. Jinap, Pectinesterase extraction from papaya. *Food Chemistry*, 1993, 47(2), 183-185.
43. T. Sakai; T. Sakamoto; J. Hallaert, and E.J. Vandamme, Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 1993, 39, 213-294.
44. M. Bordenave, Analysis of pectin methyl esterases. *Plant Cell Wall Analysis*, 1996, 17, 165-180.

45. T. Hasunuma; E.-i. Fukusaki, and A. Kobayashi, Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. *Journal of Biotechnology*, 2003, 106(1), 45-52.
46. B. Ly Nguyen; A. Van Loey; D. Fachin; I. Verlent, and I. Hendrickx, Purification, characterization, thermal, and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv Cavendish). *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 78(6), 683-691.
47. J.V. Souza; É.S. Silva; M.L. Maia, and M.F. Teixeira, Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A. UMIDA. 1. *Process Biochemistry*, 2003, 39(4), 455-458.
48. J. Gaffe; M.E. Tiznado, and A.K. Handa, Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiology*, 1997, 114(4), 1547-1556.
49. Y.L. Dorokhov; K. Mäkinen; O.Y. Frolova; A. Merits; J. Saarinen; N. Kalkkinen; J. Atabekov, and M. Saarma, A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1999, 461(3), 223-228.
50. J.R. Whitaker, Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme and Microbial Technology*, 1984, 6(8), 341-349.
51. J.R. Whitaker; A.G. Voragen, and D.W. Wong, Handbook of food enzymology. 2003: Marcel Dekker, Inc.
52. N. Schmohl; J. Pilling; J. Fisahn, and W.J. Horst, Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 2000, 109(4), 419-427.
53. Y. Guiavarc'h; D. Sila; T. Duvetter; A. Van Loey, and M. Hendrickx, Influence of sugars and polyols on the thermal stability of purified tomato and cucumber pectinmethylesterases: a basis for TTI development. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(5), 544-555.
54. Regulation (EC) No. 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive No. 83/417/EEC,

- Council Regulation (EC) No. 1493/1999, Directive No. 2000/13/EC, Council Directive No. 2001/112/EC and Regulation (EC) No. 258/97. *Official Journal of the European Union* No. L 354/7 of 31 December 2008.
55. Regulation (EU) No. 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No. 1924/2006 and (EC) No. 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive No. 87/250/EEC, Council Directive No. 90/496/EEC, Commission Directive No. 1999/10/EC, Directive No. 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives No. 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No. 608/2004. *Official Journal of the European Union* No. L 304/18 of 22 November 2011.
 56. Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union* No. L 268/1 of 18 October 2003.
 57. Commission Regulation (EU) No. 234/2011 of 10 March 2011 implementing Regulation (EC) No. 1331/2008 of the European Parliament and of the Council establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings. *Official Journal of the European Union* No. L 64/15 of 11 March 2011.
 58. União Europeia, Food enzymes (2014), [Online]. Available: http://ec.europa.eu/food/food/FAEF/enzymes/legislation_en.htm, accessed: 16-Dez-2014.
 59. X. Li; C. Xu; S.S. Korban, and K. Chen, Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2010, 29(4), 222-243.
 60. J.M. Lelièvre; A. Latche; B. Jones; M. Bouzayen, and J.C. Pech, Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 1997, 101(4), 727-739.
 61. C.S. Jones; H.V. Davies; R.J. McNicol, and M.A. Taylor, Cloning of three genes up-regulated in ripening raspberry fruit (*Rubus idaeus* cv. *Glen Clova*). *Journal of Plant Physiology*, 1998, 153(5), 643-648.

62. D. Valero; D. Martínez-Romero, and M.a. Serrano, The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 2002, 13(6), 228-234.
63. L.F. Goulao and C.M. Oliveira, Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 2008, 19(1), 4-25.
64. F. Bartolozzi; G. Bertazza; D. Bassi, and G. Cristoferi, Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1997, 758(1), 99-107.
65. K. Manning, Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 1998, 205(4), 622-631.
66. T.M. Montero; E.M. Mollá; R.M. Esteban, and F.J. López-Andréu, Quality attributes of strawberry during ripening. *Scientia Horticulturae*, 1996, 65(4), 239-250.
67. M. Draye and P. Van Cutsem, Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(11), 1152-1160.
68. S. Jiménez-Bermúdez; J. Redondo-Nevado; J. Muñoz-Blanco; J.L. Caballero; J.M. López-Aranda; V. Valpuesta; F. Pliego-Alfaro; M.A. Quesada, and J.A. Mercado, Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology*, 2002, 128(2), 751-759.
69. I. Fraeye; G. Knockaert; S.V. Buggenhout; T. Duvetter; M. Hendrickx, and A.V. Loey, Enzyme infusion and thermal processing of strawberries: Pectin conversions related to firmness evolution. *Food Chemistry*, 2009, 114(4), 1371-1379.
70. K. Manning, Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta*, 1994, 194(1), 62-68.
71. E. Krüger; H. Dietrich; E. Schöpplein; S. Rasim, and P. Kürbel, Cultivar, storage conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 60(1), 31-37.

72. F. Fortin, Editorial Director. The visual foods encyclopedia. 1996: Macmillan, New York.
73. D. Pijpers; J.G. Constant, and K. Jansen, The complete book of fruit: an illustrated guide to over 400 species and varieties of fruit from all over the World. 1986: Gallery.
74. J.N. Burdon and R. Sexton, The role of ethylene in the shedding of red raspberry fruit. *Annals of Botany*, 1990, 66(1), 111-120.
75. P.P. Iannetta; J. Van Den Berg; R.E. Wheatley; R.J. McNicol, and H.V. Davies, The role of ethylene and cell wall modifying enzymes in raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105(2), 337-346.
76. C. Aubert and C. Chanforan, Postharvest changes in physicochemical properties and volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca* L.). Characterization of 28 cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(8), 3074-3082.
77. S. Bureau; D. Ruiz; M. Reich; B. Gouble; D. Bertrand; J.M. Audergon, and C.M.G.C. Renard, Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 2009, 115(3), 1133-1140.
78. R. Lo Bianco; V. Farina; S.G. Indelicato; F. Filizzola, and P. Agozzino, Fruit physical, chemical and aromatic attributes of early, intermediate and late apricot cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(6), 1008-1019.
79. S. Bureau; C.M.G.C. Renard; M. Reich; C. Ginies, and J.M. Audergon, Change in anthocyanin concentrations in red apricot fruits during ripening. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42(1), 372-377.
80. C. Camps and D. Christen, Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42(6), 1125-1131.
81. R.C. Chandan and A. Kilara, Manufacturing yogurt and fermented milks. 2013: John Wiley & Sons.
82. M. Fishman; B. Levaj; D. Gillespie, and R. Scorza, Changes in the physico-chemical properties of peach fruit pectin during on-tree ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1993, 118(3), 343-349.

83. R. Pressey and J. Avants, Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology*, 1973, 52(3), 252-256.
84. H.-W. Zhou; L. Sonogo; A. Khalchitski; R. Ben-Arie; A. Lers, and S. Lurie, Cell wall enzymes and cell wall changes in Flavortop Nectarines: mRNA abundance, enzyme activity, and changes in pectic and neutral polymers during ripening and in woolly fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2000, 125(5), 630-637.
85. A.S.F. Ash and T.M. Reynolds, Water - soluble constituents of fruit I. Some observations on the occurrence of free galacturonic acid in fruit. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1954, 7(4), 435-443.
86. A. Schieber; R. Fgel; M. Henke, and R. Carle, Determination of the fruit content of strawberries fruit preparations by gravimetric quantification of hemicellulases. *Food Chemistry*, 2005, 91, 365-371.
87. R. Fgel; R. Carle, and A. Schieber, Quality and authenticity control of fruit pures, fruit preparations and jams - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16(10), 433-441.
88. P. Pietinen; E.B. Rimm; P. Korhonen; A.M. Hartman; W.C. Willett; D. Albanes, and J. Virtamo, Intake of dietary fiber and risk of coronary heart disease in a cohort of finnish men the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention Study. *Circulation*, 1996, 94(11), 2720-2727.
89. S. Gropper and J. Smith, Advanced nutrition and human metabolism. 2012: Cengage Learning.
90. C.W.I. Haminiuk; M.R. Sierakowski; I.G. Branco; G.M. Maciel, and M.L. Masson, Rheological study of ternary mixtures and pectic gels of red fruit pulps. *International journal of Food Science & Technology*, 2007, 42(6), 629-639.
91. G. Tabilo-Munizaga and G.V. Barbosa-Cnovas, Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 2005, 67(1), 147-156.
92. R. Maceiras; E. Álvarez, and M.A. Cancela, Rheological properties of fruit purees: Effect of cooking. *Journal of Food Engineering*, 2007, 80(3), 763-769.

93. F. Remeuf; S. Mohammed; I. Sodini, and J. Tissier, Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, 2003, 13(9), 773-782.
94. W. Lee and J. Lucey, Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, 23(9), 1127-1136.
95. J. Lucey and H. Singh, Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 1997, 30(7), 529-542.
96. Statista - The Statistics Portal [Online]. Available: <http://www.statista.com/>, accessed: 16-Dez-2014.
97. Mintel (2014), [Online]. Available: <http://www.mintel.com/>, accessed: 30-Jan-2015.
98. DSM-Food Specialties, A clean bill of health for yogurt (2014), [Online]. Available: http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en_US/news-insights/campaigns/clean-bill-of-health-for-yogurt.html, accessed: 25-Mar-2015.
99. Z. Alves, Funcionalização de pectinas e sua aplicação na indústria alimentar. Tese de Mestrado in *Departamento de Química*. 2013, Universidade de Aveiro: Aveiro.
100. J. Neves, Efeito de uma pectina metil esterase na firmeza de pedaços de Morango. Tese de Mestrado in *Departamento de Química*. 2012, Universidade de Aveiro: Aveiro.
101. S. Amaro, Funcionalização tecnológica de amidos em matérias-primas naturais. Tese de Mestrado in *Departamento de Química*. 2013, Universidade de Aveiro: Aveiro.
102. PCE Instruments U.K. and PCE Americas [Online]. Available: <http://www.industrial-needs.com/technical-data/bostwick-consistormeter-zxcon.htm>, accessed: 24-Jul-2015.
103. Linetronic Technologies [Online]. Available: <http://www.lin-tech.ch/english/brookeng.html>, accessed: 24-Jul-2015.
104. M.C. Santos; C. Nunes; M.A.M. Rocha; A. Rodrigues; S.M. Rocha; J.A. Saraiva, and M.A. Coimbra, Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for *Maillard* reaction acceleration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, 20, 51-58.

105. C. Nunes; J.A. Saraiva, and M.A. Coimbra, Effect of candying on cell wall polysaccharides of plums (*Prunus domestica* L.) and influence of cell wall enzymes. *Food Chemistry*, 2008, 111(3), 538-548.
106. N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 1973, 54(2), 484-489.
107. H.S. Ramaswamy and M. Marcotte, Food processing: principles and applications. 2006: Taylor & Francis Group, LLC.
108. P.J. Fellows, Food processing technology: principles and practice. 2009: Elsevier.
109. I. Avila and C. Silva, Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *Journal of Food Engineering*, 1999, 39(2), 161-166.
110. M.R. Ochoa; A.G. Kessler; M.B. Vullioud, and J.E. Lozano, Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: storage effect on composition and color. *LWT - Food Science and Technology*, 1999, 32(3), 149-153.
111. M.A. Coimbra; A. Barros; M. Barros; D.N. Rutledge, and I. Delgadillo, Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 37(3), 241-248.
112. N. Vlachos; Y. Skopelitis; M. Psaroudaki; V. Konstantinidou; A. Chatzilazarou, and E. Tegou, Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 573, 459-465.
113. M.A. Coimbra; I. Delgadillo; K.W. Waldron, and R.R. Selvendran, Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp. *Plant Cell Wall Analysis*, 1996, 17, 19-44.
114. I. Fraeye; T. Duvetter; I. Verlent; D. Ndaka Sila; M. Hendrickx, and A. Van Loey, Comparison of enzymatic de-esterification of strawberry and apple pectin at elevated pressure by fungal pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2007, 8(1), 93-101.
115. I. Fraeye; A. De Roeck; T. Duvetter; I. Verlent; M. Hendrickx, and A. Van Loey, Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry*, 2007, 105(2), 555-563.

116. R.J. Redgwell; M. Fischer; E. Kendal, and E.A. MacRae, Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*, 1997, 203(2), 174-181.
117. M.S. Reddy; USA, inventor. Enhancement of *Lactobacillus acidophilus* growth and viability in yogurt and other cultured dairy products patent US4797289 A. Jan. 10, 1989.
118. E. Fernandez-Garcia and J. McGregor, Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber. *European Food Research and Technology*, 1997, 6(204).
119. J.K. Pedersen; Denmark, inventor; K. Pektinfabrik; Denmark, assignee. Process for preparing gelled sour milk patent CA1047829 A1. Aug. 31, 1976.
120. A.Y. Tamime, Fermented milks. 2008: John Wiley & Sons.
121. M.J. Malone and E.A. Miles; USA, inventors; The Coca- Cola Company; USA, assignee. Artificially sweetened gelled yogurt patent US4430349 A. Feb. 7, 1984.
122. R. Pereyra; K.A. Schmidt, and L. Wicker, Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(9), 3448-3451.
123. H. Fabian and D. Naumann, Methods to study protein folding by stopped-flow FT-IR. *Methods*, 2004, 34(1), 28-40.
124. D.M. Curley; T.F. Kumosinski; J.J. Unruh, and H.M. Farrell, Changes in the secondary structure of bovine casein by Fourier transform infrared spectroscopy: Effects of calcium and temperature. *Journal of Dairy Science*, 1998, 81(12), 3154-3162.
125. USDA (United States Department of Agriculture) - Agricultural Research Service - National Nutrient Database for Standard Reference Release 27 [Online]. Available: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>, accessed: 20-May-2015.